Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

GASCHROMATOGRAPHISCH-MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER ORGANISCHEN SÄUREN IM URIN BEI PATIENTEN MIT STÖRUNGEN DER LEBERFUNKTION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Andreas Pickert
aus Berlin

1984

UNIV.
LIBRARY
BASEL

Aus der Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Eggstein
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

GASCHROMATOGRAPHISCH-MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNG DER ORGANISCHEN SÄUREN IM URIN BEI PATIENTEN MIT STÖRUNGEN DER LEBERFUNKTION

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Andreas Pickert
aus Berlin

1984

Dekan: Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Liebich
2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Gupta

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG S. 1

II. MATERIAL UND METHODEN S. 3

2.1. Chemikalien und Geräte S. 3

2.2. Analyse von organischen Säuren im Urin S. 5

2.3. Hydrolyse von Glucuronsäure- und Schwefelsäure-Konjugaten im Urin S. 7

2.4. Analyse von organischen Säuren im Urin unter Verwendung von deuteriertem Diazomethan S. 7

III. ERGEBNISSE S. 9

3.1. Patienten und Kontrollpersonen S. 9

3.2. Organische Säuren im Urin bei Patienten mit Leberzirrhose S. 11

3.3. Glucuronsäure- und Schwefelsäure-Konjugate von organischen Säuren im Urin bei Patienten mit Leberzirrhose S. 21

3.4. Verlaufsbeobachtungen der organischen Säuren im Urin nach Porto-Cavaler Shunt-Operation bei einem Patienten mit Leberzirrhose S. 25

3.5. Aromatische Carbonsäuren im Urin mit einer Methoxyphenylstruktur - Herkunft der Methylgruppen S. 30

3.6. Organische Säuren im Urin bei akutem Leberversagen S. 41

3.7. Organische Säuren in Galle und Urin bei Gallengangsverschluß S. 44

IV. DISKUSSION S. 53

4.1. Organische Säuren im Urin - pathophysiologische Bedeutung S. 53

4.2. Organische Säuren im Urin bei Störungen der Leberfunktion - Diskussion der Ergebnisse S. 54

V. ZUSAMMENFASSUNG S. 66

VI. LITERATURVERZEICHNIS S. 68

I.EINLEITUNG

In 24 Stunden werden von gesunden erwachsenen Personen ca. 60 mMol organische Säuren mit dem Urin ausgeschieden (1). Unter diesen Substanzen finden sich Abbauprodukte des Kohlenhydrat-, Fett- und Aminosäurestoffwechsels. Außerdem werden Abbauprodukte des Nucleotid- und Porphyrin-Stoffwechsels, die meisten Abbauprodukte von Hormonen, sowie nahezu alle Fremdstoffe, die in den Körper gelangen als organische Säuren mit dem Urin ausgeschieden. Die Zusammensetzung der organischen Säuren des Urins ist daher ein Spiegel der Stoffwechselaktivität des gesamten Organismus. Viele Stoffwechselkrankheiten gehen mit charakteristischer Veränderung in Konzentration und Zusammensetzung der organischen Säuren des Urins einher (2). Mit der Verbesserung der Analysentechnik in den letzten Jahren wurden immer mehr Abweichungen vom normalen Profil der organischen Säuren des Urins festgestellt, die für die eine oder andere Erkrankung charakteristisch sind (3). Die gleichzeitige Bestimmung aller organischen Säuren des Urins mit einer Analysenmethode ist derzeit noch nicht möglich. Die besten Ergebnisse in bezug auf Empfindlichkeit und Spezifität liefert die Gaschromatographie in Kombination mit der Massenspektrometrie. Sehr viele Methoden zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse von organischen Säuren im Urin sind inzwischen in der Literatur beschrieben (4).

Die Leber ist das wichtigste Stoffwechselorgan des Menschen. Durch ihre anatomische Lage zwischen Pfortadersystem und großem Kreislauf wirkt sie wie ein selektives Filter, das alle mit der Nahrung resorbierten Bestandteile passieren müssen. Die Leber ist zudem Sitz einer Reihe von Biosynthese- und Abbaureaktionen, zu denen sonst kein anderes Organ des Körpers in der

Lage ist. Hierunter fallen insbesondere die unter dem Begriff Biotransformation zusammengefaßten Abbaureaktionen für Fremdstoffe, deren Ausscheidung mit dem Urin meist erst durch spezifische Umbaureaktionen in der Leber ermöglicht wird. Die Leber produziert als exkretorische Drüse täglich ca. 500-1500 ml Galle, die neben den Gallensäuren den größten Teil der Abbauprodukte des Porphyrinstoffwechsels sowie einige Fremdstoffe, die nicht mit dem Urin ausgeschieden werden, enthält. Störungen der Leberfunktion sollten daher in vielfältiger Weise Einfluß auf die Zusammensetzung der organischen Säuren des Urins haben. Ziel dieser Dissertation war es daher mit einer bewährten Methode gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse der organischen Säuren des Urins eine größere Anzahl von Urinproben von Patienten mit verschiedenen Typen der Leberfunktionsstörung vergleichend zu untersuchen.

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien und Geräte

Sämtliche Lösungsmittel (p.A. Qualität), Methoxyamin-Hydrochlorid und Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatten wurden von E. Merck (Darmstadt) bezogen.
Amberlyst-A26 war von Serva (Heidelberg).
Diazomethan in etherischer Lösung wurde aus Nitrosomethylharnstoff hergestellt (5), (Nitrosomethylharnstoff wurde uns freundlicherweise vom Institut für organische Chemie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt) oder aus Diazald mit Diethylenglycollmonoethylether (6).
Deuteriertes Diazomethan wurde mit Hilfe des "Deutero-Diazald-Prep Sets" von EGA Chemie (Steinheim) hergestellt (6).
D_2O und Methanol-d_1 waren von EGA Chemie (Steinheim).
Ameisensäure-d_2 war von MSD-Isotopes (München).
ß-Glucuronidase-Arylsulfatase war von Boehringer (Mannheim).

Gaschromatographische Analysen wurden mit einem Modell 3700 Gaschromatographen von Varian (Darmstadt) durchgeführt. Das Gerät war für den Betrieb von Glaskapillarsäulen ausgerüstet (Eingangssplitter, Make-up Gas). Detektor war ein Flammenionisationsdetektor. Trägergas war Stickstoff. Trennsäulen waren 25 m lange WCOT-Glaskapillarsäulen belegt mit OV 17 (Perkin Elmer, Überlingen), die Anfang 1982 durch flexible Quarzkapillarsäulen belegt mit OV 1701 (SGE,Victoria, Australien) ersetzt wurden.
Die Analysenbedingungen waren:

Einspritzblock:	250°C
Splitverhältnis:	1:10
Detektor:	260°C

Abschwächung des Flammen-ionisationsdetektor:	16×10^{-12} mAs/V
Ofenraumtemperaturprogramm:	initial 40°C für 10 Min. programmiert mit 2°C/Min. bis 230°C, dann isotherm für 30 Min.

Einspritzungen wurden von Hand mit einer Hamilton Mikroliterspritze vorgenommen (1µl).

Gaschromatographisch-massenspektrometrische Analysen wurden mit einer Gerätekombination bestehend aus einem Gaschromatographen Modell 2700 (Varian, Darmstadt), einem Massenspektrometer Modell CH 5 (Varian MAT, Bremen) und einem Computer "Spektrosystem SS-100" (Varian, Paolo Alto, Californien, USA) durchgeführt. Der Gaschromatograph war zum Betrieb von Glaskapillarsäulen umgerüstet worden (4). Trägergas war Helium, alle anderen Bedingungen waren wie oben beschrieben. Gaschromatograph und Massenspektrometer waren über eine offene Kopplung miteinander verbunden (4). Die Trennbedingungen im Massenspektrometer waren:

Arbeitsdruck:	ca. 3×10^{-5} Torr
Ionisation durch Elektronenstoß mit Elektronenenergie:	70 eV
Ionenbeschleunigung:	3 kV

Ionentrennung durch einen Sektorfeldmagneten

Ionenregistrierung durch einen Sekundärelektronenvervielfacher

Massenscan:	im Bereich m/e 28 bis m/e 400
Dauer eines Massenscans:	ca. 4,5 Sekunden.

Alle Massenspektren wurden auf Magnetband aufgezeichnet. Die Auswertung und Identifizierung der Massenspektren mit Hilfe einer Bibliothek von Referenzsubstanzen erfolgte durch den Computer; die Details des Verfahrens sind an anderer Stelle beschrieben (4).

2.2. Analyse von organischen Säuren im Urin

Harnproben von 30 ml bzw. 60 ml wurden mit 2 Volumen Isopropanol versetzt. Ausgefallenes Material wurde abzentrifugiert. Zur Derivatisierung der Keto-Gruppen wurde der Überstand mit Methoxyamin-Hydrochlorid versetzt (50 mg Methoxyamin-Hydrochlorid/10 ml Urin) und für eine Stunde bei 60°C inkubiert. Organische Säuren wurden durch Anionenaustauschchromatographie an Amberlyst-A26 isoliert. Glassäulen von 20 x 1,5 cm wurden mit 30 cm^3 des Ionenaustauschers gefüllt. Die Säulen wurden vor Gebrauch in die OH^--Form überführt und mit 66%igem Isopropanol aequilibriert. Hierzu wurden die Säulen sukzessive mit folgenden Lösungen gewaschen (je ca. 100 ml):

5 % konz. HCL in Methanol, 1 N HCL, H_2O bidest.,
1 N NaOH, H_2O bidest., 66 % Isopropanol.

Nach Auftragen des Urins wurden die Begleitsubstanzen durch waschen mit 66%igem Isopropanol und Methanol entfernt. Die organischen Säuren wurden mit 8 ml Ameisensäure in 192 ml Methanol von der Säule eluiert. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer bis auf einen geringen Rest abgezogen und der Rückstand sofort anschließend mit einem großen Überschuß an Diazomethan methyliert. Nach einer Reaktionszeit von ca. 12 Stunden (über Nacht) wurde das Reagenz im Stickstoffstrom bis auf einen kleinen Rest abgeblasen. Der Rückstand wurde als 13 cm lange Bande auf eine präparative Dünnschichtchromatographieplatte mit Fluoreszenzindikator aufgetragen. Am rechten Rand der Platte wurde eine Mischung aus vier Referenzsubstanzen (Stearinsäuremethylester, Phenylessigsäuremethylester, Indolbuttersäuremethylester und Weinsäuredimethylester) aufgetragen. Die Dünnschichtchromatographieplatte wurde sukzessive in zwei verschiedenen Fließmittelsystemen entwickelt:

Fließmittel I: n-Heptan / Chloroform / Diethylether (40/30/30) bis zum oberen Rand der Platte.

Die Steighöhe der Indolbuttersäure (sichtbar durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm) wurde markiert und die Platte anschließend in einem Fließmittelsystem II bis zur Steighöhe der Indolbuttersäure entwickelt.

Fließmittel II: cyclo-Hexan / Chloroform / Methanol (40/55/5).

Mit Hilfe der Referenzsubstanzen wurde die Dünnschichtchromatographieplatte in vier Zonen eingeteilt:

Zone 1 - Oberkante der Dünnschichtplatte bis Phenylessigsäuremethylester

Zone 2A - Phenylessigsäuremethylester bis Mitte zwischen Phenylessigsäuremethylester und Indolbuttersäuremethylester

Zone 2B - Mitte zwischen Phenylessigsäuremethylester und Indolbuttersäuremethylester bis Indolbuttersäuremethylester

Zone 3 - Indolbuttersäuremethylester bis Weinsäuredimethylester.

Das Kieselgel wurde in den zuvor beschriebenen vier Zonen ausgekratzt und in kleinen Soxhlet-Extraktoren ca. 12 Stunden (über Nacht) mit Dichlormethan extrahiert. Am nächsten Morgen wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom bis auf einen kleinen Rest abgeblasen. Der Rückstand wurde mit Essigsäureethylester in ein kleines mit Septumkappe verschließbares Glasgefäß transferiert. In diesem Gefäß wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom auf 50 µl konzentriert. Die fertigen Proben wurden bis zur gaschromatographischen bzw. gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt. Die Analysenmethode wird an anderer Stelle im Detail diskutiert (4).

2.3. Hydrolyse von Glucuronsäure- und Schwefelsäure-Konjugaten im Urin

In eine mit Schliffstopfen verschließbaren Erlenmeyer-Kolben wurden 60 ml Urin und 60 ml 0,1 molarer Acetatpuffer pH 4,66 gegeben. Hierzu kamen 2 ml einer ß-Glucuronidase/Arylsulfatase Enzymsuspension mit einer Aktivität von 4,5 U/ml Glucuronidase und 40 U/ml Sulfatase. Zur Verhinderung von Bakterienbewuchs wurde 1 ml Toluol zugesetzt. Anschließend wurde 15 Minuten lang mit einer Pasteur-Pipette Stickstoff in die Lösung eingeleitet um den Sauerstoff aus der Reaktionsatmosphäre zu verdrängen. Dann wurde der Kolben mit einem gut dichtenden Schliffstopfen verschlossen und 12 Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Wegen des großen Lösungsmittelvolumens von 120 ml wurde die Probe in zwei gleich große Teile geteilt und jeweils wie eine gewöhnliche 60 ml Harnprobe bis zur Dünnschichtchromatographie weiterverarbeitet. Vor der Dünnschichtchromatographie wurden die beiden Teile wieder vereinigt. Die Methode wurde in modifizierter Form aus der Literatur übernommen (7).

2.4. Analyse von organischen Säuren im Urin unter Verwendung von deuteriertem Diazomethan

Eine Harnprobe von 60 ml wurde in zwei gleiche Teile geteilt. Die eine Hälfte wurde wie eine normale Harnprobe aufgearbeitet (siehe 2.2.) unter Verwendung von Diazomethan, welches aus Diazald hergestellt wurde. Mit der anderen Hälfte des Urins wurde wie folgt verfahren:
Nach Darstellung der Methoxime wurde die Harnprobe auf die Amberlyst-A26 Ionenaustauschchromatographiesäule aufgetragen. Nach waschen mit 200 ml 66%igem Isopropanol und 100 ml Methanol wurde mit 100 ml Methanol-d_1 gewaschen.

Die organischen Säuren wurden mit 8 ml Ameisensäure-d_2 in 192 ml Methanol-d_1 von der Ionenaustauschersäule eluiert. Das Lösungsmittel wurde anschließend im Rotationsverdampfer bis auf einen kleinen Rest abgezogen und der Rückstand mit einer frisch präparierten Lösung von Deutero-Diazomethan in wasserfreiem Ether methyliert. Die weiteren Schritte entsprachen den in 2.2. beschriebenen (Dünnschichtchromatographie).

Die Isotopenreinheit des Deutero-Diazomethans wurde wie folgt bestimmt: 100 mg Benzoesäure wurden in 25 ml wasserfreiem Diethylether gelöst. Die Lösung wurde in einem kleinen Scheidetrichter 4 mal mit je 5 ml 99,5%igem D_2O gewaschen. Anschließend wurde mit dem zuvor dargestellten deuterierten Diazomethan im Überschuß methyliert (6, 8). (Siehe Teil 3.5.)

III. ERGEBNISSE

3.1. Patienten und Kontrollpersonen

20 Urinproben (größtenteils 24-Stunden-Sammelurin, einige Spontanurinproben) von Patienten und Kontrollpersonen wurden für diese Studie analysiert. Die überwiegende Anzahl der Proben stammte von Patienten aus der Medizinischen Universitätsklinik in Tübingen. Drei Urinproben des Patienten mit der Porto-Cavalen Shunt-Operation waren aus der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Reutlingen. Die Galle und der Urin des Patienten mit dem kompletten Verschlußikterus waren aus der Chirurgischen Universitätsklinik in Tübingen. Die Kontrollpersonen waren gesunde Mitarbeiter des Laboratoriums. Die Galle des Patienten mit dem kompletten Verschlußikterus wurde in die Studie mit aufgenommen, weil eine einmalige Gelegenheit bestand von einem Patienten am selben Tag Galle und Urin zu analysieren, und weil es sich gezeigt hatte, daß sich Galle wie eine normale Urinprobe aufarbeiten läßt. In Tabelle 1 sind die Proben zusammengestellt. Probe Nr. 2 und Probe Nr. 6, bei denen eine enzymatische Hydrolyse von Glucuronsäure- und Schwefelsäure-Konjugaten durchgeführt wurde waren jeweils identisch mit Probe Nr. 1 und Probe Nr. 5, bei denen dieser Schritt nicht durchgeführt worden war. Probe Nr. 15, bei der das deuterierte Diazomethan zum Einsatz kam, wurde zu Beginn in zwei gleich große Teile geteilt (siehe Teil 2.4.). Alle Proben wurden gaschromatographisch analysiert; die mit Sternchen markierten Proben wurden zusätzlich gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert.

Tabelle 1: Patienten und Kontrollpersonen

Nr.	Name	geschl.	Menge	Diagnose-Bemerkungen
1*	J.W.	m	60 ml	gesunde Kontrollperson
2*	J.W.	m	60 ml	gesunde Kontrollperson,enzymatische Hydrolyse von Konjugaten
3*	B.T.	w	30 ml	gesunde Kontrollperson
4*	A.P.	m	175 ml	gesunde Kontrollperson[1]
5*	D.G.	m	60 ml	Leberzirrhose
6*	D.G.	m	60 ml	Leberzirrhose,enzymatische Hydrolyse von Konjugaten
7	M.D.	w	30 ml	Leberzirrhose
8	H.Sch.	m	30 ml	Leberzirrhose
9	R.S.	m	30 ml	Leberzirrhose
10*	A.A.	w	30 ml	Leberzirrhose, Denver Shunt
11	O.K.	m	30 ml	Leberzirrhose
12*	W.R.	m	60 ml	Leberzirrhose,Porto-Cavaler Shunt 2.postoperativer Tag
13*	W.R.	m	60 ml	Leberzirrhose,Porto-Cavaler Shunt 6. postoperativer Tag
14*	W.R.	m	60 ml	Leberzirrhose,Porto-Cavaler Shunt 8. postoperativer Tag
15*	W.K.	m	60 ml	Leberzirrhose,Spleno-Renaler Shunt Deuteriertes Diazomethan
16*	E.W.	w	30 ml	akutes Leberversagen,Benzolvergiftung
17*	M.S.	w	30 ml	akutes Leberversagen,Pilzvergiftung 2.Tag
18*	M.S.	w	30 ml	akutes Leberversagen,Pilzvergiftung 6.Tag
19*	M.S.	w	30 ml	akutes Leberversagen,Pilzvergiftung 8.Tag
20*	G.Sch.	m	30 ml	Urin,Gallengangsverschluß
21*	G.Sch.	m	30 ml	Galle, Gallengangsverschluß

*) Diese Proben wurden gaschromatographisch-massenspektrometrisch analysiert. Die übrigen Proben wurden nur gaschromatographisch analysiert.

1) Diese Probe wurde zunächst 24 Stunden lyophilisiert und dann in 60 ml H_2O gelöst um wie die anderen Urinproben weiterverarbeitet werden zu können.

3.2. Organische Säuren im Urin bei Patienten mit Leberzirrhose

Die verwendete Analysenmethode erlaubt keine exakt quantitativen Aussagen über die Konzentration der einzelnen Substanzen im Urin. Semiquantitative Angaben sind durch Betrachtung des Mengenverhältnisses der einzelnen Substanzen zueinander jedoch möglich. In den Abbildungen 1 bis 6 sind Gaschomatogramme verschiedener Dünnschichtchromatographiezonen jeweils einer gesunden Kontrollperson und eines Patienten mit Leberzirrhose gegenüber gestellt. Beim Vergleich der Profile organischer Säuren bei Gesunden und Patienten mit Leberzirrhose fanden sich zusammengefaßt die folgenden Veränderungen:
Bei Gesunden überwiegen mengenmässig die Hippursäure, die einfachen Dicarbonsäuren (Malonsäure bis Sebacinsäure) und bei einigen Proben die 2-Oxoglutarsäure im Profil der organischen Säuren des Urins. Regelmäßig ist auch die 4-Methoxyphenylessigsäure anzutreffen.
Bei Patienten mit Leberzirrrhose fand sich ein überproportionaler Anstieg der Bernsteinsäure im Vergleich zu den anderen Dicarbonsäuren, ferner kam es zu einem deutlichen Anstieg der aromatischen Carbonsäuren sowie zu einem Anstieg der 4-Methoxyhippursäure, Indolessigsäure und Phenacetylglutaminsäure. Im Urin von Patienten mit Leberzirrhose fanden sich unter den aromatischen Carbonsäuren auch solche in relativ hoher Konzentration, die sich bei Gesunden überhaupt nicht oder nur in sehr geringer Konzentration nachweisen lassen. In den Abbildungen 7 bis 10 sind die Massenspektren (jeweils Referenzsubstanz und Substanz aus Urin) der 4-Methoxymandelsäure und 3,4-Dimethoxymandelsäure wiedergegeben, die sich so verhielten. In Tabelle 2 sind alle diejenigen Substanzen aufgeführt, die regelmäßig bei der gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse der organischen Säuren des Urins gefunden wurden. Alle Substanzen konnten durch Massen-

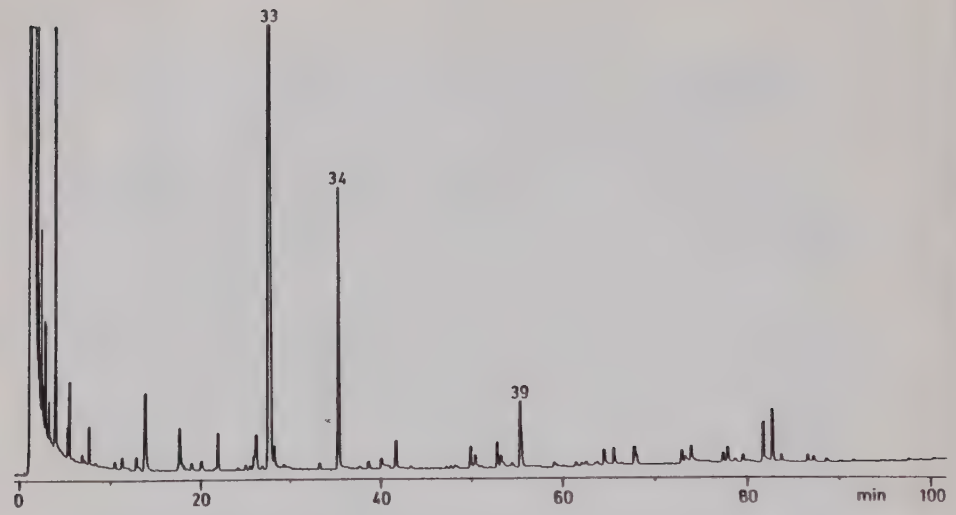


Abb. 1: Gaschromatogramm eines Gesunden (B.F.). Dünnschichtchromatographiezone 2A. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

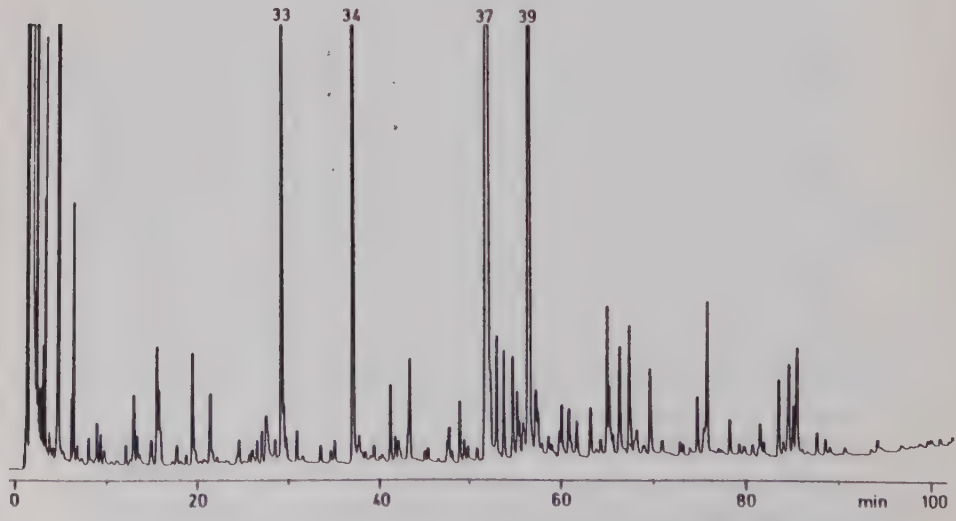


Abb. 2: Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose (A.A.). Dünnschichtchromatographiezone 2A. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

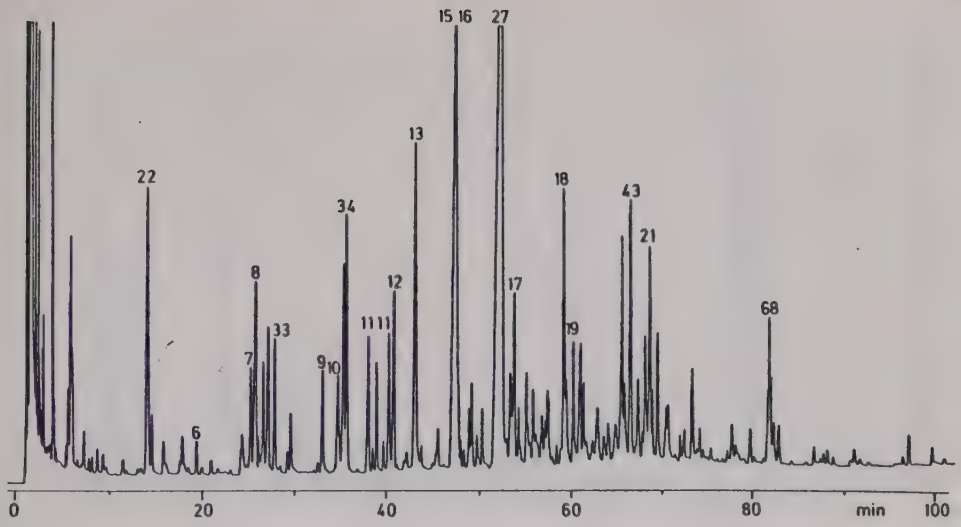


Abb. 3: Gaschromatogramm eines Gesunden (B.T.). Dünnschichtchromatographiezone 2b. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

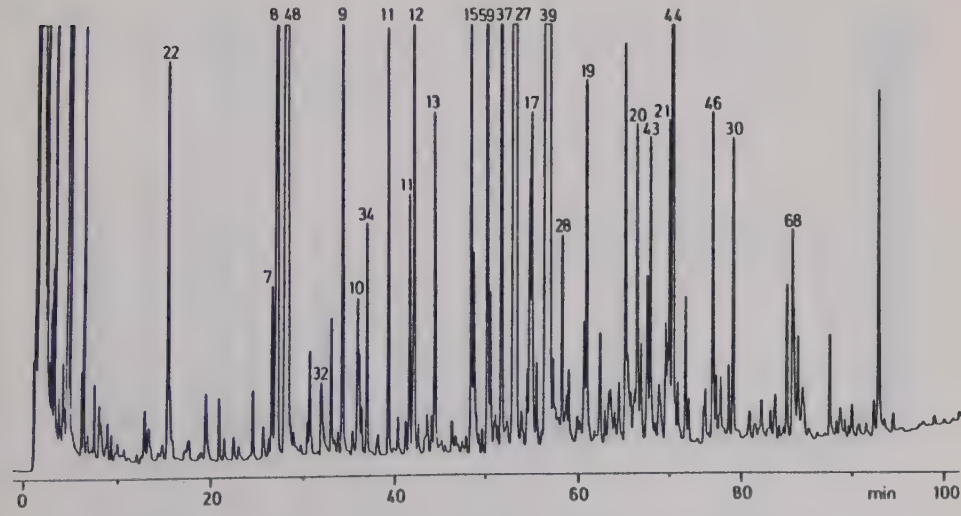


Abb. 4: Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose (R.S.). Dünnschichtchromatographiezone 2b. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

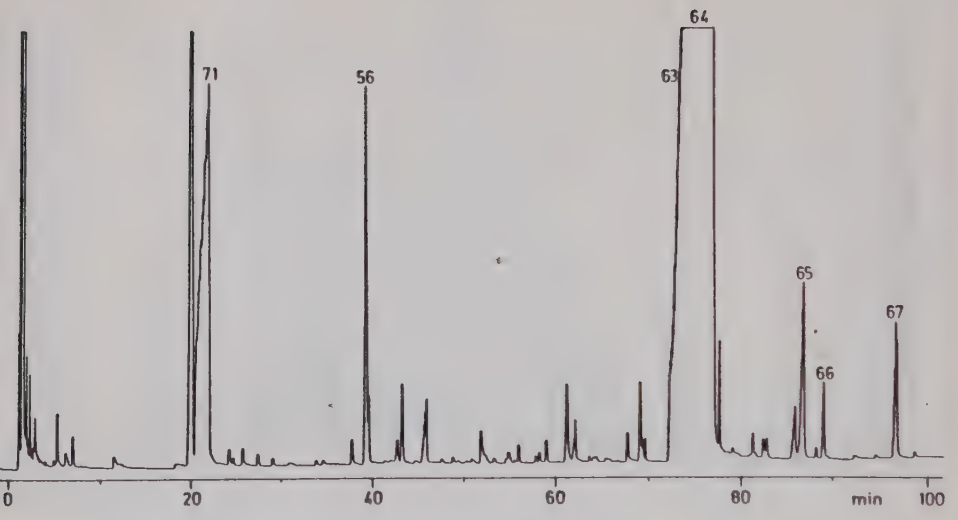


Abb. 5: Gaschromatogramm eines Gesunden (B.T.). Dünnschichtchromatographiezone 3. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

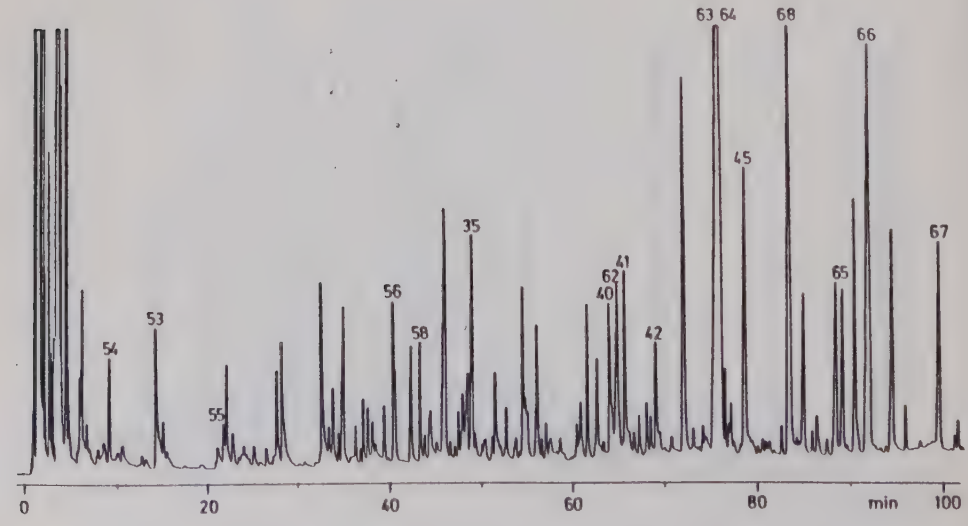


Abb. 6: Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose (H.G.). Dünnschichtchromatographiezone 3. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

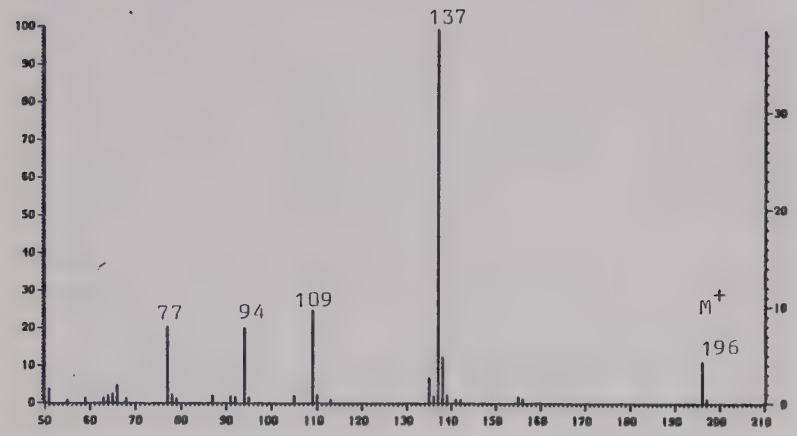
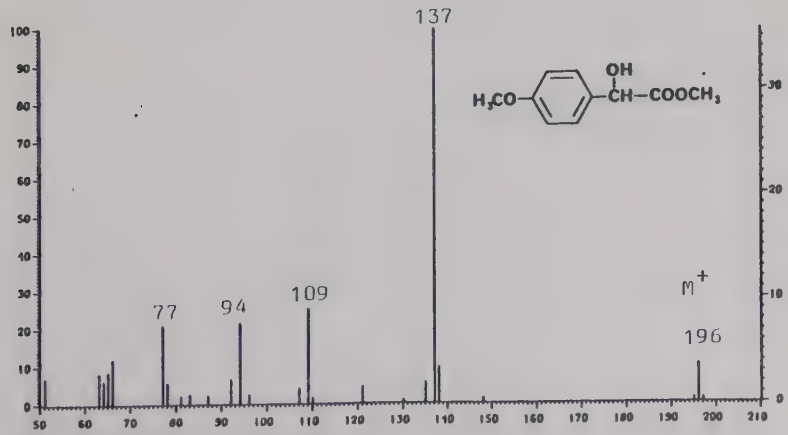


Abb. 7: Massenspektrum des 4-Methoxymandelsäuremethylesters aus Urin

Abb. 8: Massenspektrum des 4-Methoxymandelsäuremethylesters (Referenzsubstanz)



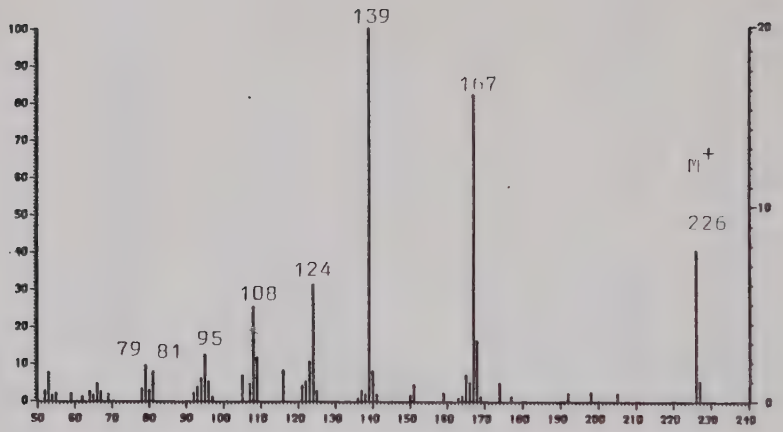
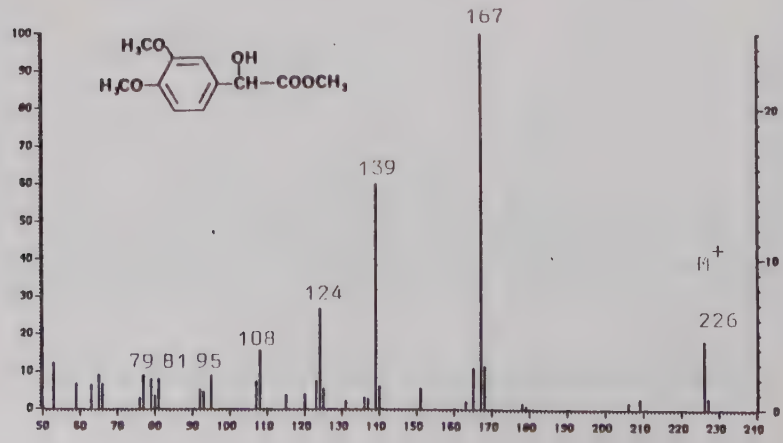


Abb. 9: Massenspektrum des 3,4-Dimethoxymandelsäuremethylesters aus Urin

Abb. 10: Massenspektrum des 3,4-Dimethoxymandelsäuremethylesters (Referenzsubstanz)



spektrum und gaschromatographische Retentionszeit eindeutig identifiziert werden (die Details des Verfahrens werden an anderer Stelle ausführlich beschrieben, 4). Durch Hinzufügen des Plus- oder Minuszeichens hinter die Substanzen wurde das unterschiedliche Verhalten bei Gesunden und Patienten mit Leberzirrhose dokumentiert. Es war nicht möglich alle Verbindungen in den Gaschromatogrammen durch Massenspektrometrie zu identifizieren. In einigen Fällen konnte gezeigt werden, daß es sich um Artefakte handelte, die aus den verwendeten Reagenzien stammten. Diese Artefakte sowie die nicht identifizierten Verbindungen wurden bei der Betrachtung der Unterschiede zwischen Patienten mit Leberzirrhose und Gesunden außer acht gelassen.

Tabelle 2: Liste der bei Gesunden und Patienten mit Leberzirrhose im Urin identifizierten organischen Säuren.
++ Konzentrationserhöhung
+ vorhanden
- nicht vorhanden
(Zahlen in Klammern beziehen sich auf Literaturangaben).

Nr.	Name	Gesunde	Patienten
1	Myristinsäure	+	+
2	Palmitinsäure	+	+
3	Ölsäure	+	+
4	Stearinsäure	+	+
5	Malonsäure	+	+
6	Methylmalonsäure	+	-
7	Ethylmalonsäure	+	+
8	Bernsteinsäure	+	++
9	Glutarsäure	+	+
10	3-Methylglutarsäure	+	+
11	3-Methylglutaconsäure	+	+
12	Adipinsäure	+	+
13	3-Methyladipinsäure	+	+
14	Muconsäure	-	+
15	3,4-Methylenadipinsäure (9)	+	+
16	Pimelinsäure	+	+
17	Korksäure	+	+
18	3,4-Methylenkorksäure (9)	+	+
19	Azelainsäure	+	+
20	Sebacinsäure	+	+
21	5,6-Decindisäure (10)	+	+
22	Brenztraubensäure	+	+
23	2-Oxoisovaleriansäure	-	(+)
24	2-Oxo-3-methylvaleriansäure	-	(+)
25	2-Oxo-Isocapronsäure	-	(+)
26	Lävulinsäure	+	+
27	2-Oxoglutarsäure	+	+

Tabelle 2: Fortsetzung

Nr.	Name	Gesunde	Patienten
28	2-Oxoadipinsäure	-	+
29	Phenylbrenztraubensäure	-	+
30	4-Methoxyphenylbrenztraubensäure	+	++
31	Phenol	-	+
32	m-Kresol und p-Kresol	+	+
33	Benzoesäure	+	+
34	Phenylessigsäure	+	+
35	Mandelsäure	-	+
36	Phenylmilchsäure	-	+
37	4-Methoxybenzoesäure	+	++
38	2-Methoxyphenylessigsäure	+	++
39	4-Methoxyphenylessigsäure	+	++
40	4-Hydroxyphenylessigsäure	+	++
41	4-Methoxymandelsäure	-	+
42	4-Methoxyphenylmilchsäure	-	+
43	3,4-Dimethoxybenzoesäure	+	++
44	3,4-Dimethoxyphenylessigsäure	+	++
45	3,4-Dimethoxymandelsäure	+	++
46	3,4-Dimethoxyphenylpropionsäure	+	++
47	Furan-2-carbonsäure (11)	+	+
48	5-Methyl-furan-2-carbonsäure (11)	+	+
49	5-Propyl-4-methyl-furan-3-carboxy-4-(3-propionsäure) (11)	+	+
50	5-Pentyl-4-methyl-furan-3-carboxy-4-(3-propionsäure) (11)	+	+
51	Glycollsäure	+	+
52	Milchsäure	+	+
53	3-Hydroxyisobuttersäure (11)	+	+
54	3-Methyl-3-hydroxybuttersäure (11)	+	+
55	2-Ethyl-3-hydroxypropionsäure	+	+
56	3-Methyl-3-hydroxyglutarsäure	+	+

Tabelle 2: Fortsetzung

Nr.	Name	Gesunde	Patienten
57	Äpfelsäure	+	+
58	2-Isopropyl-2-hydroxybernsteinsäure (11)	+	+
59	Anthranilsäure	+	+
60	Nicotinsäure	+	+
61	3-Methylcrotonylglycin (11)	+	+
62	Furoylglycin (11)	+	+
63	Picolinylglycin (11)	+	+
64	Hippursäure	+	+
65	3-Methoxyhippursäure	+	+
66	4-Methoxyhippursäure	+	++
67	Phenacetylglutaminsäure	+	++
68	Indolessigsäure	+	++
69	Indolmilchsäure	-	+
70	Indolpropionylglycin (12)	-	+
71	Trimethylphosphat	+	+

3.3. Glucuronsäure- und Schwefelsäure-Konjugate von organischen Säuren im Urin bei Patienten mit Leberzirrhose

Glucuronsäure- und Schwefelsäure-Konjugate von organischen Säuren lassen sich wegen ihres hohen Molekulargewichts und ihres polaren Charakters nicht gaschromatographisch analysieren. Eine indirekte Bestimmung ist möglich durch enzymatische Abspaltung der Glucuronsäure und Schwefelsäure von den organischen Säuren. Analysiert man eine Harnprobe ohne und mit enzymatischer Hydrolyse so müssen diejenigen Substanzen, deren Konzentration nach enzymatischer Hydrolyse im Profil der organischen Säuren stark ansteigt ursprünglich als Glucuronsäure- bzw. Schwefelsäure-Konjugate vorgelegen haben. Dieser Weg wurde bei der Urinprobe eines Gesunden und eines Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose beschritten. Auffällige Unterschiede fanden sich in den Gaschromatogrammen der Dünnschichtfraktion 2B. In Abbildung 11 bis 14 sind die Gaschromatogramme dieser Zonen jeweils mit und ohne enzymatischer Hydrolyse wiedergegeben. Nach enzymatischer Hydrolyse befinden sich um Urin des Gesunden starke Erhöhungen von drei Peaks. Der erste Peak, der mit der Bernsteinsäure zusammenfällt, konnte massenspektrometrisch als Phenol identifiziert werden; Phenol ist in der Urinprobe ohne enzymatische Hydrolyse nicht nachweisbar. Der zweite Peak (zwischen Lävulinsäure und Glutarsäure) konnte massenspektrometrisch als ein Gemisch von m-Kresol und p-Kresol identifiziert werden. Der dritte Peak am Ende des Chromatogramms konnte massenspektrometrisch als Indolessigsäure identifiziert werden. Im Unterschied zur Urinprobe des Gesunden läßt sich der Urinprobe des Patienten mit Leberzirrhose auch ohne enzymatische Hydrolyse freies Phenol nachweisen (zusammen mit Bernsteinsäure). Ein drastischer Konzentrationsanstieg von m-Kresol und p-Kresol sowie Indolessigsäure, wie bei der Urinprobe des Gesunden, entsteht nach enzymatischer

Hydrolyse nicht. Die Interpretation dieser Ergebnisse wird durch die Tatsache erschwert, daß es auch bei sorgfältigem Arbeiten nicht möglich ist die Zoneneinteilung auf der Dünnschichtchromatographieplatte exakt zu reproduzieren. Dadurch ergeben sich geringfügige Abweichungen im Profil der verschiedenen Dünnschichtchromatographiezonen. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse dieses Experiments nochmals zusammengefaßt.

Tabelle 3: Glucuronsäure- und Schwefelsäure-Konjugate von organischen Säuren im Urin bei einem Gesunden und einem Patienten mit Leberzirrhose.
++ Konzentrationsanstieg
+ vorhanden
- nicht vorhanden

Gesunder:	ohne Konjugatspaltung	mit Konjugatspaltung
Phenol	-	++
m-Kresol und p-Kresol	+	++
Indolessigsäure	+	++
Patient:		
Phenol	+	+
m-Kresol und p-Kresol	+	+
Indolessigsäure	+	+

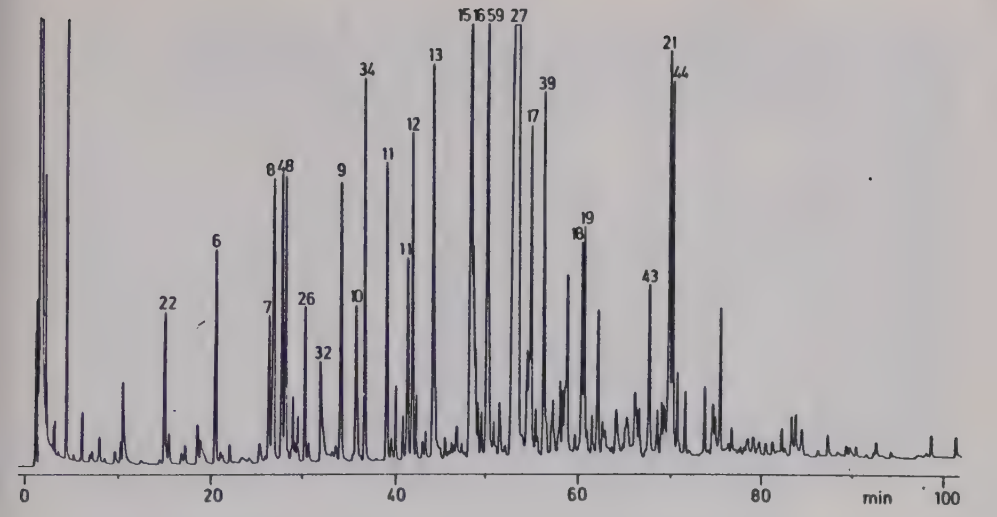


Abb. 11: Gaschromatogramm eines Gesunden (J.W.). Dünnschicht-chromatographiezone 28. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

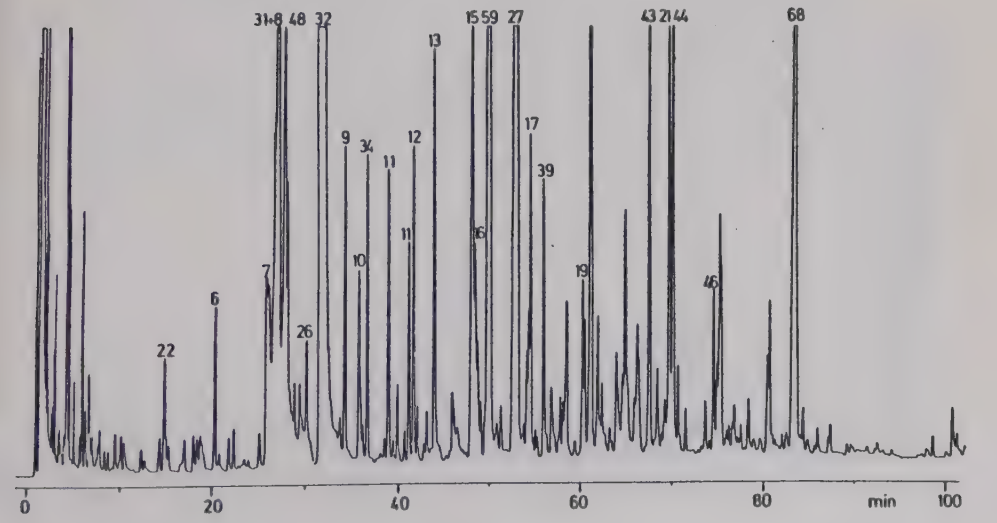


Abb. 12: Gaschromatogramm eines Gesunden nach enzymatischer Hydrolyse von Konjugaten (J.W.). Dünnschichtchromatographiezone 25. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

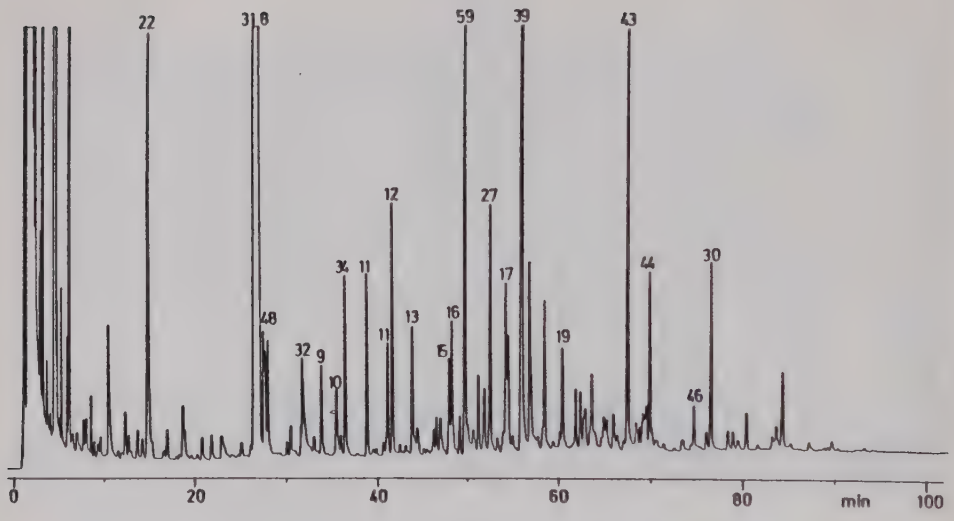


Abb. 13: Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose (U.G.) Dünnschichtchromatographiezone 2B. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

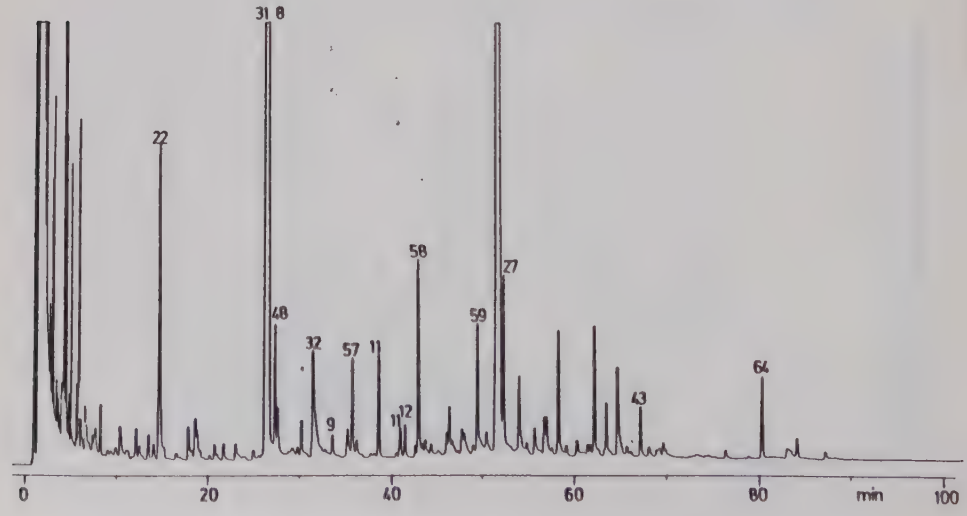


Abb. 14: Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose nach enzymatischer Hydrolyse von Konjugaten (U.G.) Dünnschichtchromatographiezone 2B. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

3.4. Verlaufsbeobachtungen der organischen Säuren im Urin nach Porto-Cavaler Shunt-Operation bei einem Patienten mit Leberzirrhose

Bei einem Patienten mit Leberzirrhose wurde wegen rezidivierender Oesophagusvarizenblutungen ein Porto-Cavaler Shunt angelegt zur Druckentlastung des Pfortaderkreislaufsystems. In der unmittelbaren postoperativen Phase konnten mehrere Urinproben gesammelt werden. Bis zum zweiten postoperativen Tag wurde der Patient parenteral mit 500 kcal (Glucose-Aminosäuregemisch) ernährt. Ab dem dritten postoperativen Tag erfolgte ein langsamer Kostaufbau zunächst mit Schleim, dann mit eiweißreduzierter Diät (30 g/d Eiweiß bis zum sechsten postoperativen Tag, 60 g/d Eiweiß ab dem siebten postoperativen Tag). Urinproben vom zweiten, sechsten und achten postoperativen Tag wurden analysiert. Im Profil der organischen Säuren des Urins zeigten sich sehr charakteristische Veränderungen. In den Abbildungen 15 bis 20 sind die Gaschromatogramme von verschiedenen Dünnschichtzonen jeweils vom zweiten und achten postoperativen Tag gegenüber gestellt. In Tabelle 4 sind diejenigen organischen Säuren aufgelistet, bei denen sich im postoperativen Verlauf eine deutliche Veränderung gezeigt hatte.

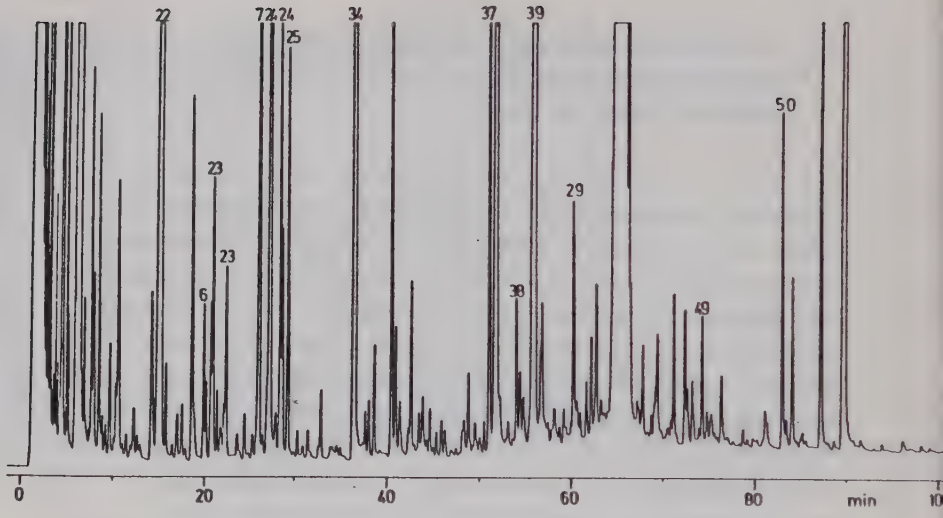


Abb. 15 : Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose (W.R.) nach Porto-Cavaler Shunt-Operation, 2. post-operativer Tag. Dünnschichtchromatographiezone 2A. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

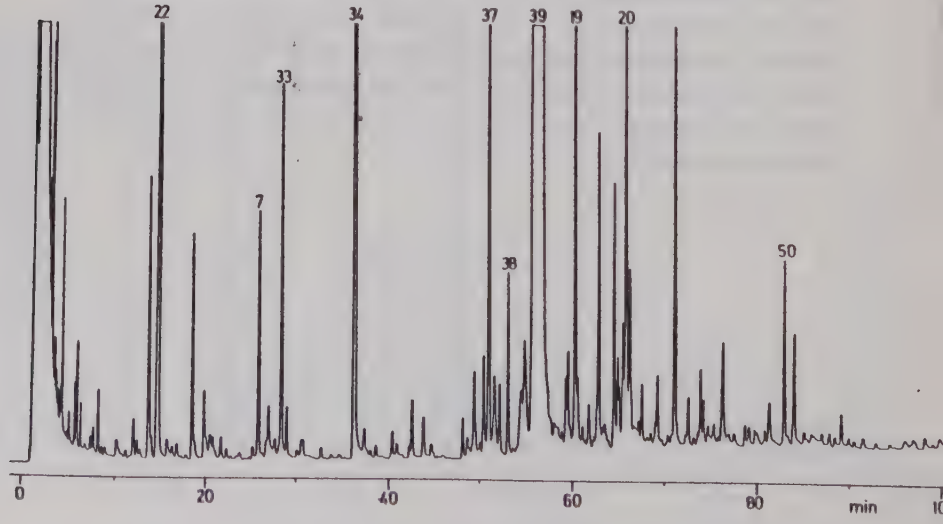


Abb. 16 : Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose (W.R.) nach Porto-Cavaler Shunt-Operation, 8. post-operativer Tag. Dünnschichtchromatographiezone 2A. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

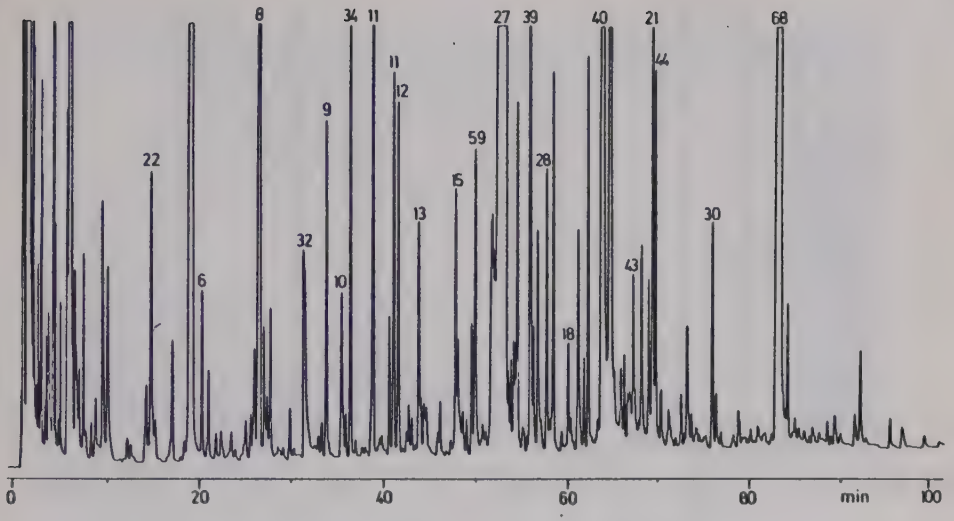


Abb. 17: Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose (W.R.) nach Porto-Cavaler Shunt-Operation, 2. postoperativer Tag. Dünnschichtchromatographiezone 2B. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2

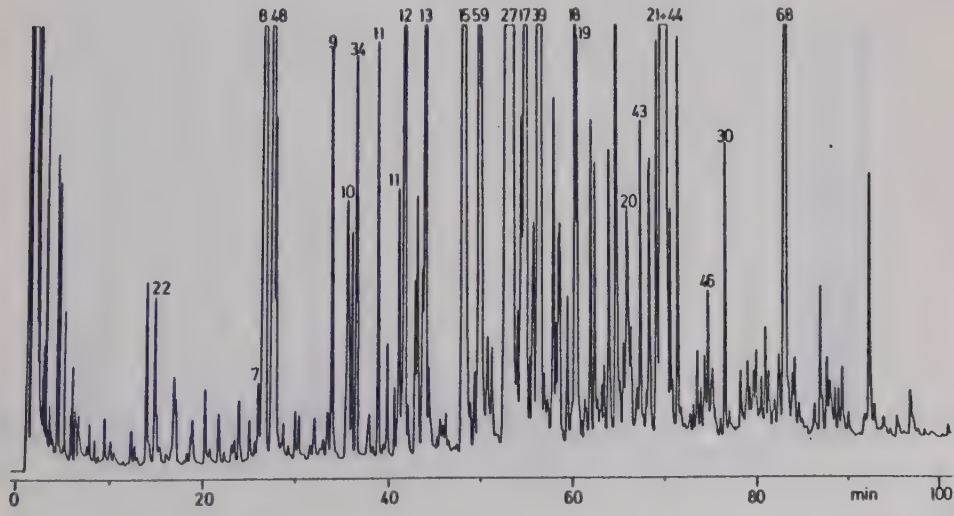


Abb. 18: Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose (W.R.) nach Porto-Cavaler Shunt-Operation, 8. postoperativer Tag. Dünnschichtchromatographiezone 2B. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

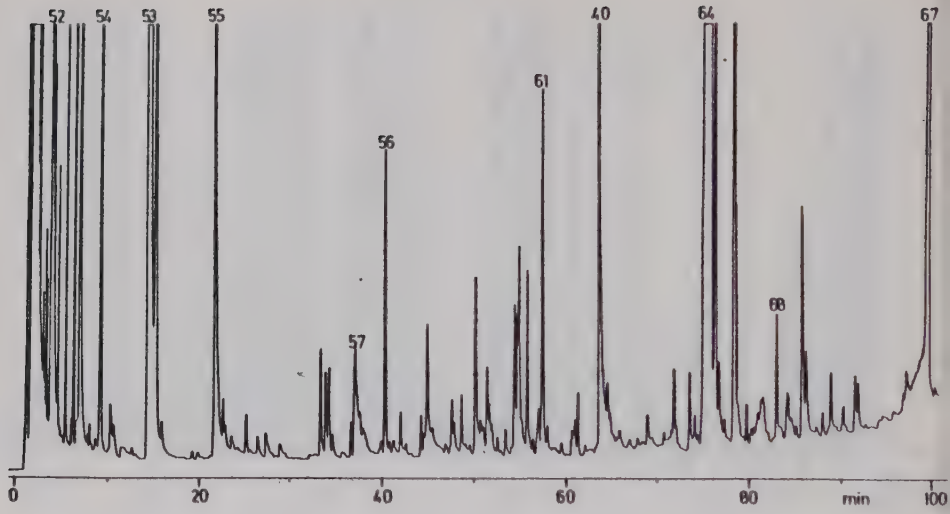


Abb. 19: Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose (W.R.) nach Porto-Cavaler Shunt-Operation, 2. postoperativer Tag. Dünnschichtchromatographiezone 3. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

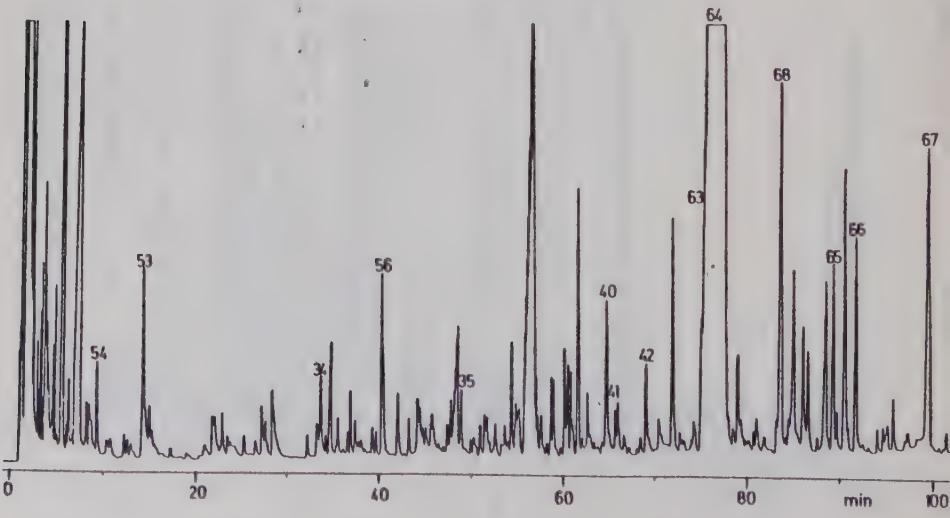


Abb. 20: Gaschromatogramm eines Patienten mit Leberzirrhose (W.R.) nach Porto-Cavaler Shunt-Operation, 8. postoperativer Tag. Dünnschichtchromatographiezone 3. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 2.

Tabelle 4: Veränderungen im Profil der organischen Säuren nach Porto-Cavaler Shunt-Operation.
++ Konzentrationserhöhung
+ vorhanden
- nicht vorhanden

Substanz	2.	6.	8. postoperativer Tag
Brenztraubensäure	++	+	+
2-Oxoisovaleriansäure	++	+	-
2-Oxo-3-methylvaleriansäure	+	-	-
2-Oxoisocapronsäure	+	-	-
2-Oxoglutarsäure	++	+	+
Phenylessigsäure	+	++	++
4-Methoxybenzoesäure	+	++	++
4-Methoxyphenylessigsäure	+	++	++
4-Methoxyphenylbrenztraubensäure	-	+	+
4-Methoxyphenylmilchsäure	-	-	+
Milchsäure	+	+	-
2-Hydroxybuttersäure	+	-	-
3-Hydroxyisobuttersäure	++	+	+
3-Methylcrotonylglycin	+	-	-
Hippursäure	+	++	++
3-Methoxyhippursäure	-	-	+
4-Methoxyhippursäure	-	+	++
Indolessigsäure	+	++	++
Phenacetylglutaminsäure	+	++	++

3.5. Aromatische Carbonsäuren im Urin mit einer Methoxyphenylstruktur - Herkunft der Methylgruppen

Diazomethan, das zur Darstellung der Methylester verwendet wurde, führt zu einer Reihe von Nebenprodukten (5). Phenolische OH-Gruppen werden nahezu quantitativ zu den entsprechenden Phenylmethylethern umgesetzt. Durch Verwendung von Deuterium-markiertem Diazomethan war es möglich bei einer Urinprobe auf Grund der charakteristischen Massenverschiebung im Massenspektrum festzustellen, ob eine oder mehrere Methylgruppen auf eine aromatische Carbonsäure übertragen worden sind. Deuteriertes Diazomethan wurde nach einer Methode von EGA Chemie (Steinheim) dargestellt (siehe Teil 2.4.). Abbildung 21 zeigt das Massenspektrum des Benzoesäuremethylesters dargestellt aus Benzoesäure und dem für das Experiment verwendeten Deuterium-markierten Diazomethan. Eine charakteristische Massenverschiebung um drei Masseneinheiten beweist den Einbau einer Methylgruppe. Ein Satelliten-Peak mit dem Molekulargewicht des nicht-Deuterium-markierten Benzoesäuremethylesters (m/e 136) war nur mit einer Intensität von weniger als 1% der Intensität des Peaks mit dem Molekulargewicht des Deuterium-markierten Benzoesäuremethylesters (m/e 139) vorhanden. (In der Abbildung nicht dargestellt). Dies zeigt, daß die Isotopenreinheit des für das Experiment verwendeten Diazomethan ca. 99% betrug.

Eine Urinprobe eines Patienten mit Leberzirrhose, bei dem wegen rezidivierenden Oesophagusvarizenblutungen im Intervall ein Spleno-Renaler Shunt (Warren-Shunt) angelegt worden war, wurde für dieses Experiment verwendet. Die Urinprobe wurde in zwei Teile geteilt; ein Teil wurde mit unmarkiertem Diazomethan umgesetzt; der andere Teil wurde mit Deuterium-markiertem Diazomethan umgesetzt (siehe Teil 2.2.). Bei gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse

konnten sieben aromatische Carbonsäuren mit einer Methoxyphenylstruktur nachgewiesen werden, bei denen das aufgenommene Massenspektrum so gut war, daß eine eindeutige Aussage über das Isotopenverhältnis möglich war. In den Abbildungen 23 bis 36 sind jeweils das Massenspektrum der unmarkierten und der Deuterium-markierten Verbindung, so wie sie im Urin gefunden wurde, übereinander abgebildet. Mit Ausnahme des 3,4-Dimethoxybenzoesäuremethylesters, bei dem ein Ísotopengemisch gefunden wurde, war es überall möglich auf Grund der Massenverschiebung eindeutig eine Substanz zu identifizieren, die ursprünglich im Urin vorgelegen haben muß. In Tabelle 5 ist die Interpretation der Massenspektren zusammengefaßt dargestellt. Im Massenspektrum des 3,4-Dimethoxybenzoesäuremethylesters und 3,4-Dimethoxyphenylessigsäuremethylesters fand sich jeweils eine Massenverschiebung um sechs Einheiten, die den Einbau von zwei Methylgruppen beweist. Nur auf Grund des Massenspektrums kann nicht entschieden werden, welche der beiden phenolischen OH-Gruppen mit dem Diazomethan reagiert hat. Die in Tabelle 5 vorgeschlagene Struktur ist jedoch sehr wahrscheinlich, wenn man die quantitativen Angaben aus der Literatur über die Ausscheidung der einzelnen aromatischen Carbonsäuren mit dem Urin berücksichtigt (1).

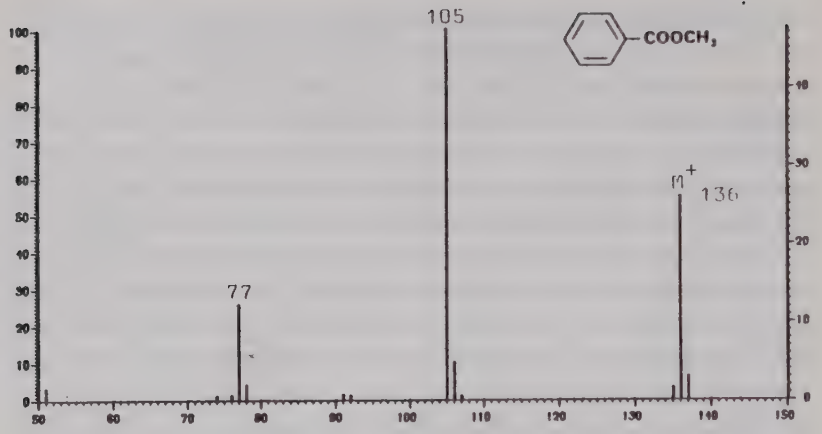
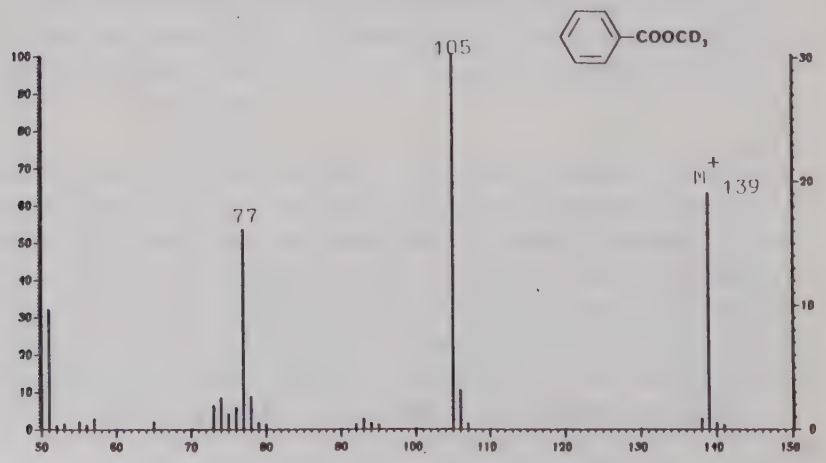


Abb. 21: Massenspektrum des Benzoesäuremethylesters

Abb. 22: Massenspektrum des Benzoesäuremethylesters-d_3



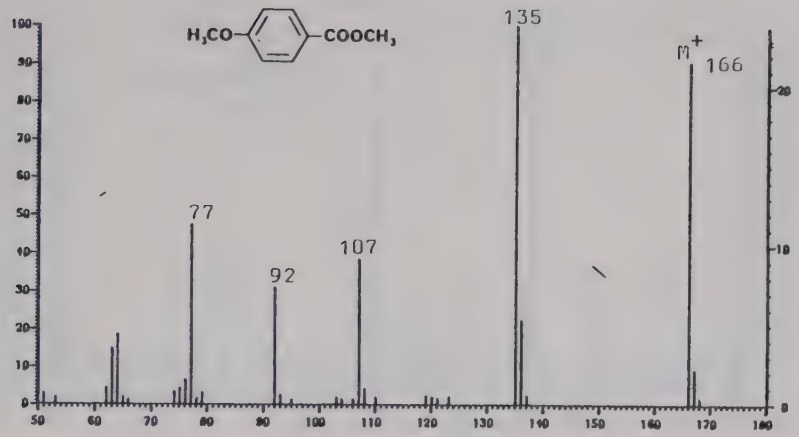
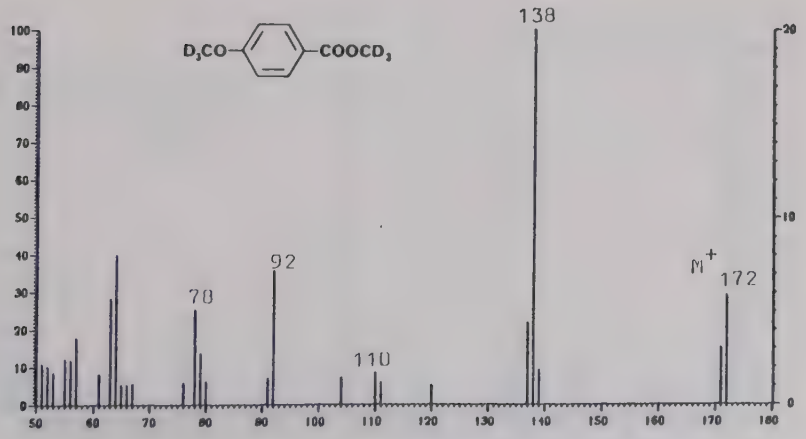


Abb. 23: Massenspektrum des 4-Methoxybenzoesäuremethylesters

Abb. 24: Massenspektrum des 4-Methoxybenzoesäuremethylesters-d_6 aus einer Urinprobe



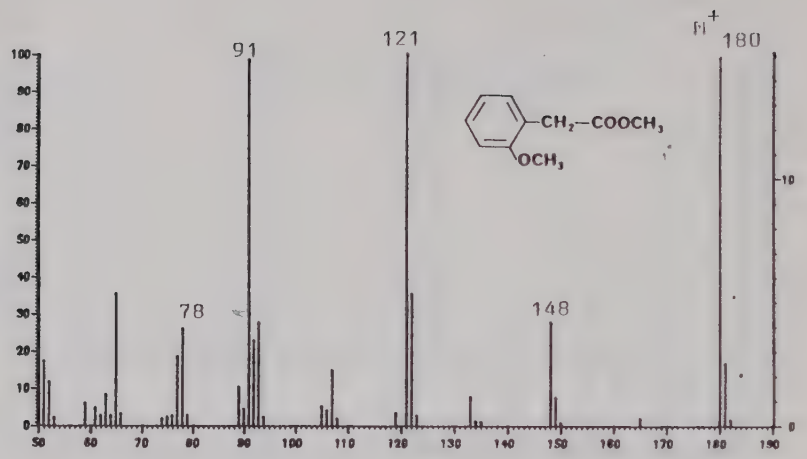
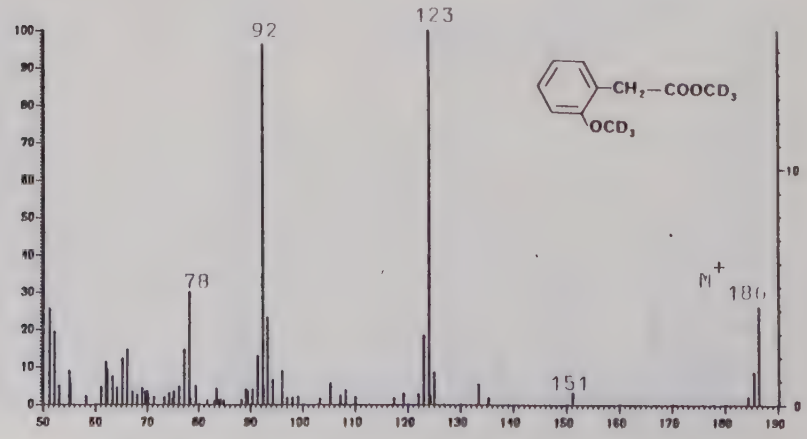


Abb. 25: Massenspektrum des 2-Methoxyphenylessigsäuremethylesters

Abb. 26: Massenspektrum des 2-Methoxyphenylessigsäuremethylesters-d_6 aus einer Urinprobe



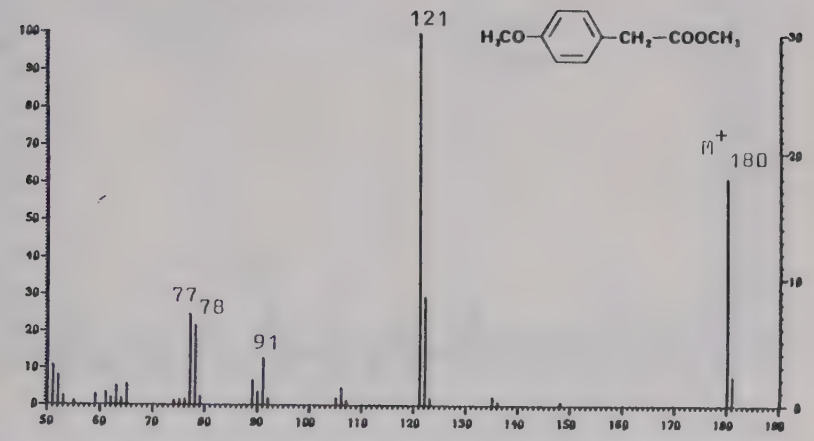
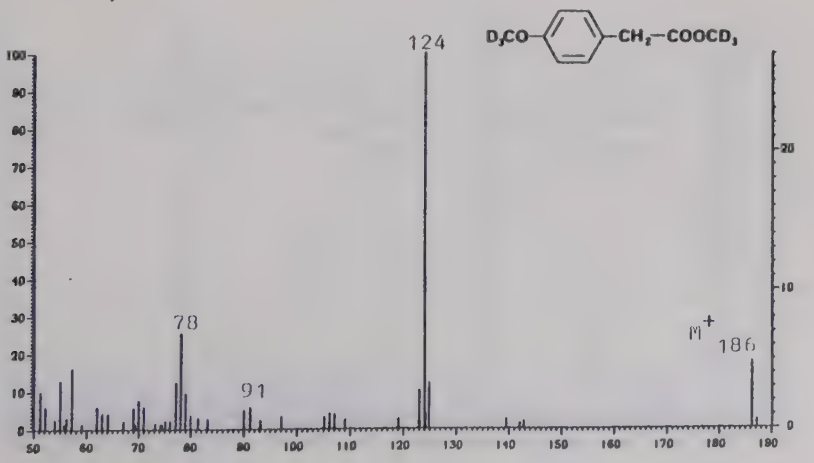


Abb. 27: Massenspektrum des 4-Methoxyphenylessigsäuremethylesters

Abb. 28: Massenspektrum des 4-Methoxyphenylessigsäuremethylesters-d_6 aus einer Urinprobe



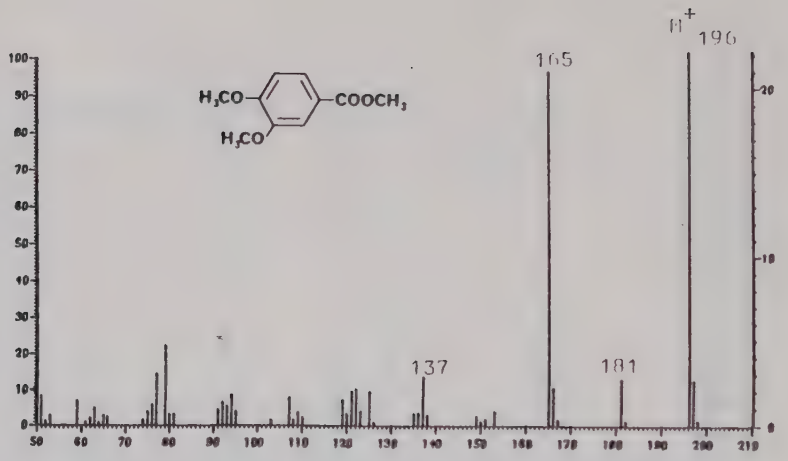
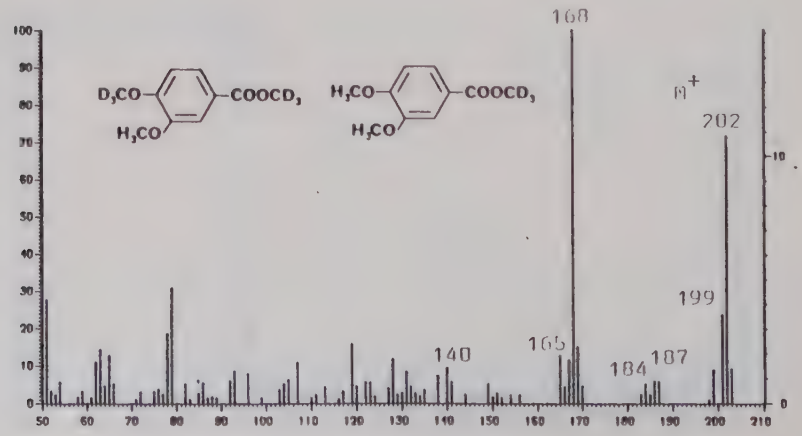


Abb. 29: Massenspektrum des 3,4-Dimethoxybenzoesäuremethylesters

Abb. 30: Massenspektrum des 3,4-Dimethoxybenzoesäuremethylesters-d_6/-d_3 aus einer Urinprobe



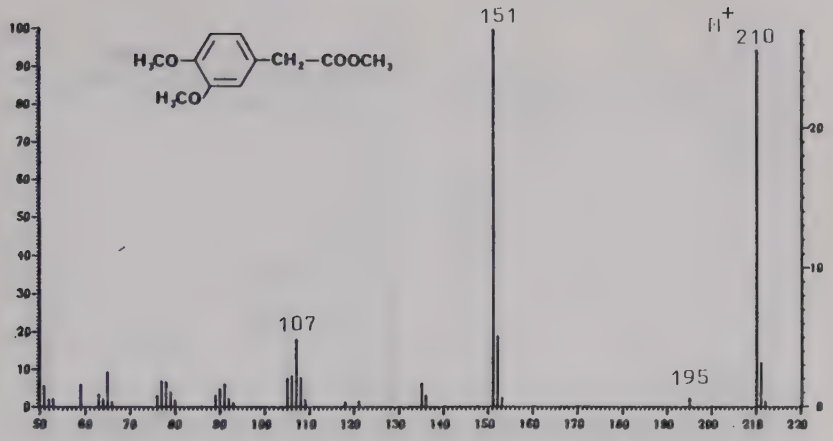
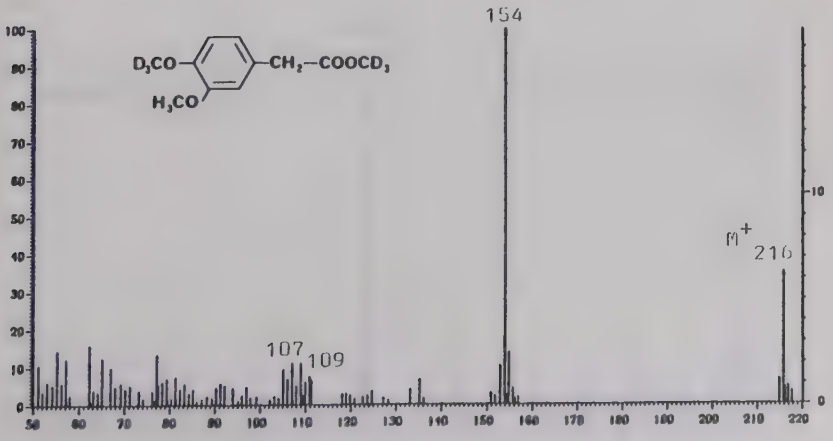


Abb. 31: Massenspektrum des 3,4-Dimethoxyphenylessigsäure-methylesters

Abb. 32: Massenspektrum des 3,4-Dimethoxyphenylessigsäure-methylesters-d_6 aus einer Urinprobe



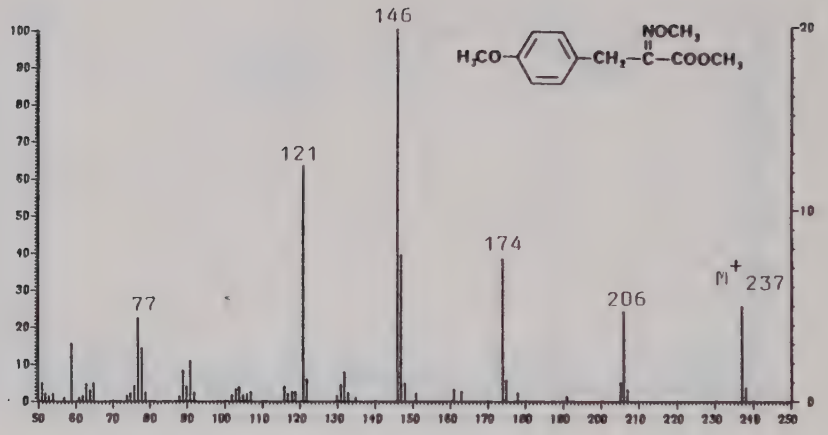
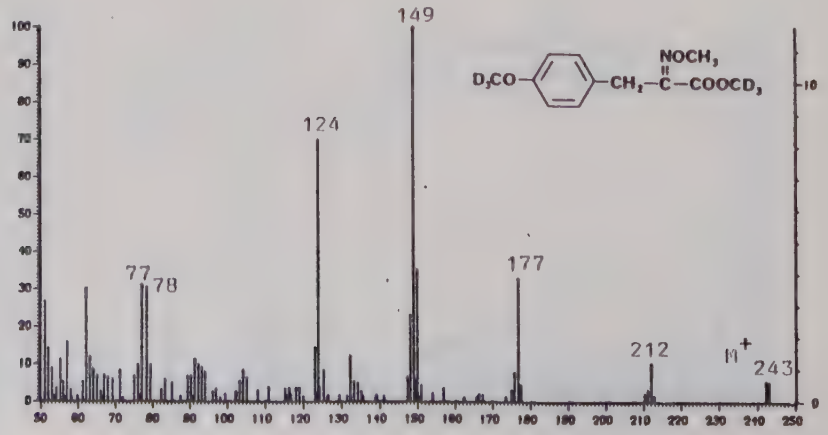


Abb. 33: Massenspektrum des 4-Methoxyphenylbrenztraubensäure--Methoxim-Methylesters

Abb. 34: Massenspektrum des 4-Methoxyphenylbrenztraubensäure--Methoxim-Methylesters-d_6 aus einer Urinprobe



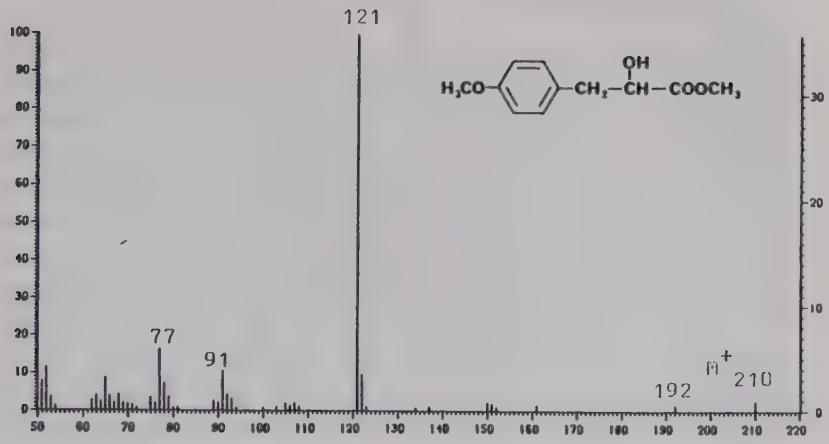


Abb. 35: Massenspektrum des 4-Methoxyphenylmilchsäuremethylesters

Abb. 36: Massenspektrum des 4-Methoxyphenylmilchsäuremethylesters-d_6 aus einer Urinprobe

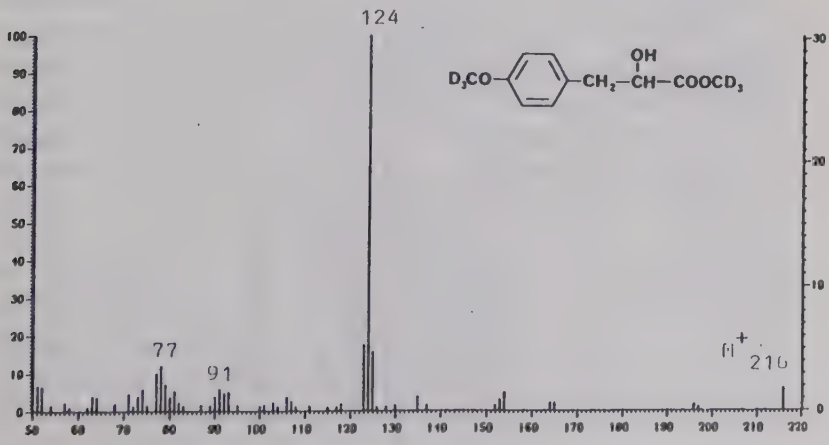


Tabelle 5: Massenverschiebungen bei phenolischen Carbonsäuren des Urins nach Reaktion mit deuteriertem Daizomethan. M-H = Molekülmasse bei Verwendung von normalem Diazomethan, M-D = Molekülmasse bei Verwendung von Deuterium-markiertem Diazomethan. M-S = Massenverschiebung.

Struktur bei GC-MS Analyse		M-H	M-D	M-S	Struktur im Urin
4-Methoxybenzoes.-Methylester		166	172	+6	4-Hydroxybenzoes.
2-Methoxyphenylessigs.-Methylester		180	186	+6	2-Hydroxyphenylessigs.
4-Methoxyphenylessigs.-Methylester		180	186	+6	4-Hydroxyphenylessigs.
4-Methoxybrenztraubens.-Methylester-Methoxim		237	243	+6	4-Hydroxyphenylbrenztraubens.
4-Methoxyphenylmilchs.-Methylester		210	216	+6	4-Hydroxyphenylmilchs.
3,4-Dimethoxybenzoes.-Methylester	90%	196	202	+6	3-Methoxy-4-Hydroxybenzoes.
	10%	196	199	+3	3,4-Dimethoxybenzoes.
3,4-Dimethoxyphenylessigs.-Methylester		210	216	+6	3-Methoxy-4-Hydroxyphenylessigs.

3.6. Organische Säuren im Urin bei akutem Leberversagen

Die erste Urinprobe war von einer jungen Frau, die in suizidaler Absicht eine unbekannte Menge Benzol zu sich genommen hatte. Wenige Stunden nach Aufnahme des Giftes kam es zu einer schweren Leberschädigung mit einem Anstieg der Transaminasen GOT und GPT auf über 1000 IE/l. Im weiteren Verlauf erholte sich die Patientin unter intensivmedizinischer Therapie von ihrer Vergiftung. Eine Sammelurinprobe der ersten 24 Stunden nach Aufnahme des Giftes wurde analysiert. Der Urin hatte eine tiefdunkelgrüne Farbe; diese Farbe wurde mit dem Ionenaustauscher aus dem Urin extrahiert. Nach Methylierung mit Diazomethan änderte sich der Farbton in dunkelbraun; nach Auftragen auf die Kieselgel-Dünnschichtchromatographieplatte entfärbte sich die Probe zunehmend. Bei gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse fanden sich keine für Benzol typischen Abbauprodukte (Phenole). Die Veränderungen bei den übrigen organischen Säuren sind in Tabelle 6 zusammengefaßt.

Drei weitere Urinproben bei akutem Leberversagen wurden von einer Patientin gesammelt, die eine große Menge grüner Knollenblätterpilze (Amanita phalloides) gegessen hatte. 20 Stunden nach Aufnahme des Pilzgerichtes kam es bei der Patientin zu schweren Vergiftungssymptomen (Erbrechen, Kollaps). Neben den üblichen intensivmedizinischen Maßnahmen wuede bei der Patientin 24 Stunden nach Aufnahme des Gifts eine Hämoperfusion über einen Aktivkohlefilter durchgeführt. Im weiteren Verlauf verschlechterte sich der Zustand der Patientin zunehmend; es kam zu einem Anstieg der Transaminasen auf mehrere 1000 IE; es entwickelte sich ein akutes Nierenversagen; präfinal mußte die Patientin beatmet werden; am 9. Tag nach Aufnahme des Gifts verstarb die Patientin im Zustand der Agonie. Urinproben vom 2., 6. und 8.Tag nach Aufnahme des giftigen Pilzgerichts wurden

analysiert. Die Veränderungen im Profil der organischen Säuren des Urins sind in Tabelle 6 zusammengefaßt wiedergegeben. Die Interpretation der Veränderungen im Profil der organischen Säuren bei beiden Patientinnen mit akutem Leberversagen ist schwierig. Beide Patientinnen befanden sich in intensivmedizinischer Therapie; unter anderem wurde eine forcierte Diurese durchgeführt, Magen- und Duodenalsaft über eine Sonde kontinuierlich abgesaugt, durch purgierende Maßnahmen zusammen mit hohen Einläufen eine Darmreinigung durchgeführt und eine Vielzahl verschiedener Medikamente gegeben. In Tabelle 6 sind daher nur globale Veränderungen der einzelnen Substanzklassen wiedergegeben, die sich bei Analyse der verschiedenen Urinproben ergeben hatten.

Tabelle 6: Organische Säuren im Urin bei akutem Leberversagen
++ Anstieg der Konzentration
+ gleichbleibende Konzentration
- Abfall der Konzentration

Substanzklasse siehe unten	Stadium des maximalen Transaminasenanstiegs	Präfinales Stadium
Fettsäuren	+	++
Dicarbonsäuren	+	-
Oxocarbonsäuren	++	-
Aromatische Carbonsäuren	+	-
Hydroxycarbonsäuren	++	-
Hippursäure	+	+

Fettsäuren: Myristinsäure, Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure

Dicarbonsäuren: Bernsteinsäure, 3-Methylglutaconsäure, Adipinsäure, 3-Methyladipinsäure, Korksäure

Oxocarbonsäuren: Brenztraubensäure, 2-Oxoisovaleriansäure, 2-Oxo-3methylvaleriansäure, 2-Oxoisocarponsäure, 2-Oxoglutarsäure

Aromatische Carbonsäuren: Benzoesäure, Phenylessigsäure, 4-Methoxybenzoesäure, 4-Methoxyphenylessigsäure

Hydroxycarbonsäuren: Glycollsäure, Milchsäure, 3-Hydroxybuttersäure, 3-Hydroxyisobuttersäure

3.7. Organische Säuren in Galle und Urin bei Gallengangsverschluß

Bei einem Patienten mit Pancreaskopfcarcinom kam es zu einem tumorbedingten Verschluß der abführenden Gallenwege. Nach Perkutaner-Transhepatischer-Cholangiographie (PTC) wurde eine Drainage über die Punktionsnadel in das gestaute Gallengangssystem gelegt zur Entlastung des schweren Stauungsikterus mit einem direkten Bilirubin von 20 mg%. 24 Stunden nach Anlage der Drainage, zu einem Zeitpunkt zu dem das Röntgenkontrastmittel komplett ausgeschieden war, wurden Galle und Urin des Patienten analysiert. In der Abbildungen 37 bis 44 sind jeweils die Gaschromatogramme von Galle und Urin aller vier Dünnschichtzonen übereinander wiedergegeben. In Tabelle 7 sind die verschiedenen organischen Säuren, die bei gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse von Galle und Urin gefunden wurden aufgelistet. Unterschiede in der Konzentration wurden wie in Tabelle 2 durch Plus- oder Minuszeichen dokumentiert. Im Urin des Patienten mit Gallengangsverschluß wurde 3,4-Dimethoxyphenylmilchsäure identifiziert. Abbildung 45 zeigt das Massenspektrum der aus dem Urin isolierten Substanz; Abbildung 46 zeigt das Massenspektrum der entsprechenden käuflichen Referenzsubstanz. 3,4-Dimethoxyphenylmilchsäure war zuvor noch in keiner Serum- oder Urinprobe identifiziert worden.

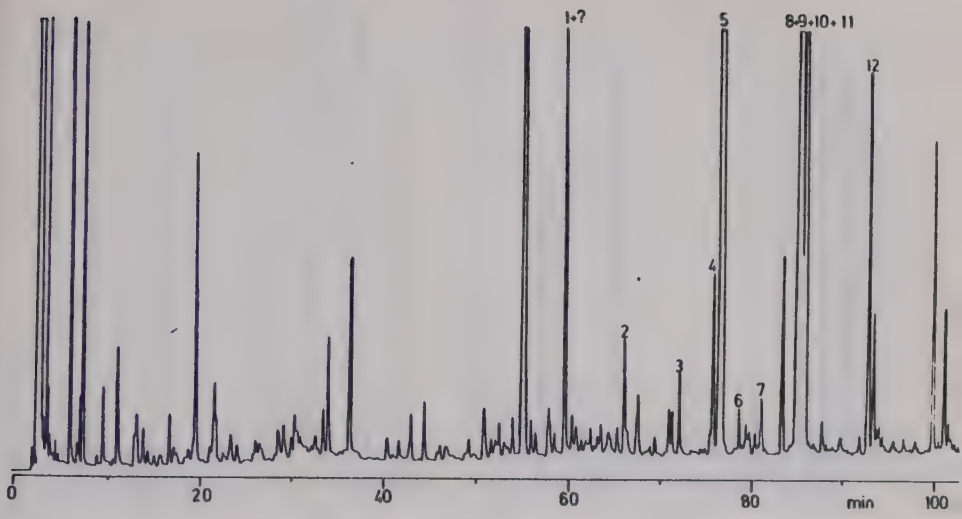


Abb. 37: Gaschromatogramm von Galle eines Patienten mit Gallengangsverschluß. Dünnschichtchromatographiezone 1. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 7.

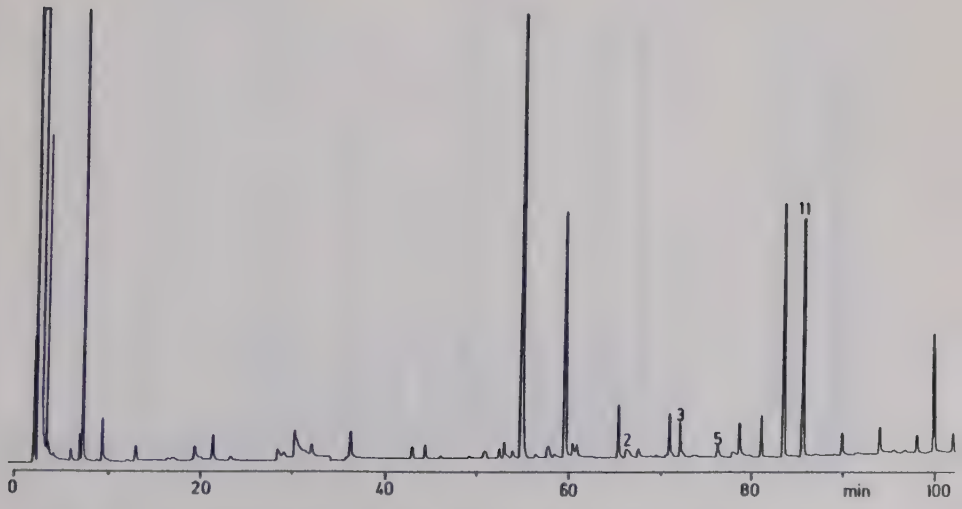


Abb. 38: Gaschromatogramm von Urin eines Patienten mit Gallengangsverschluß. Dünnschichtchromatographiezone 1. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 7.

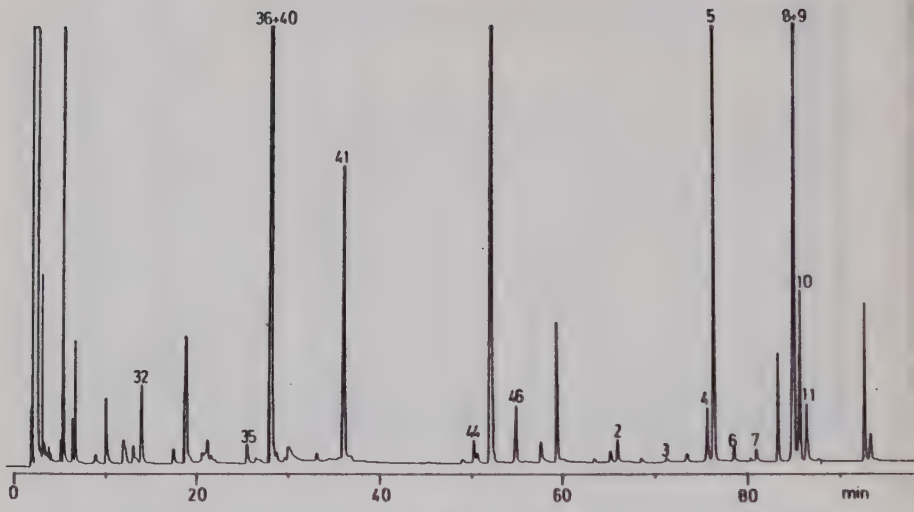


Abb. 39: Gaschromatogramm von Galle eines Patienten mit Gallengangsverschluß. Dünnschichtchromatographiezone 2A. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 7.

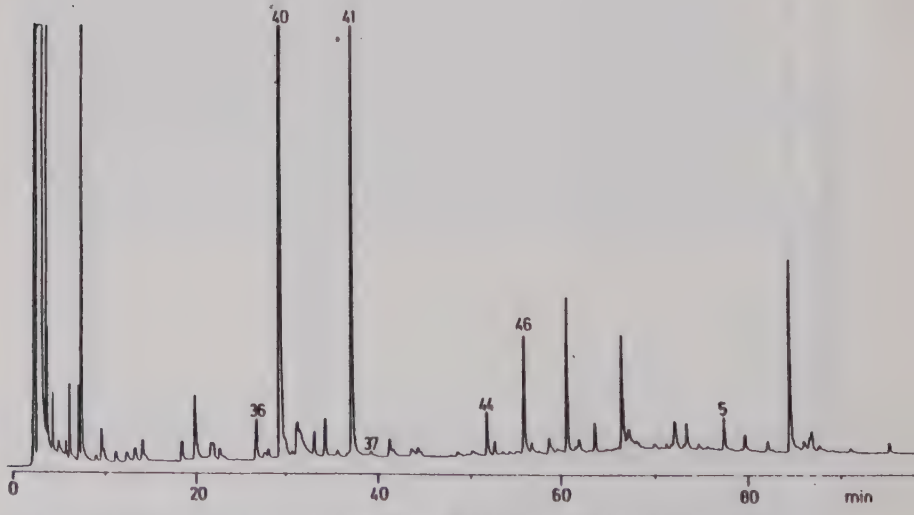


Abb. 40: Gaschromatogramm von Urin eines Patienten mit Gallengangsverschluß. Dünnschichtchromatographiezone 2A. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 7.

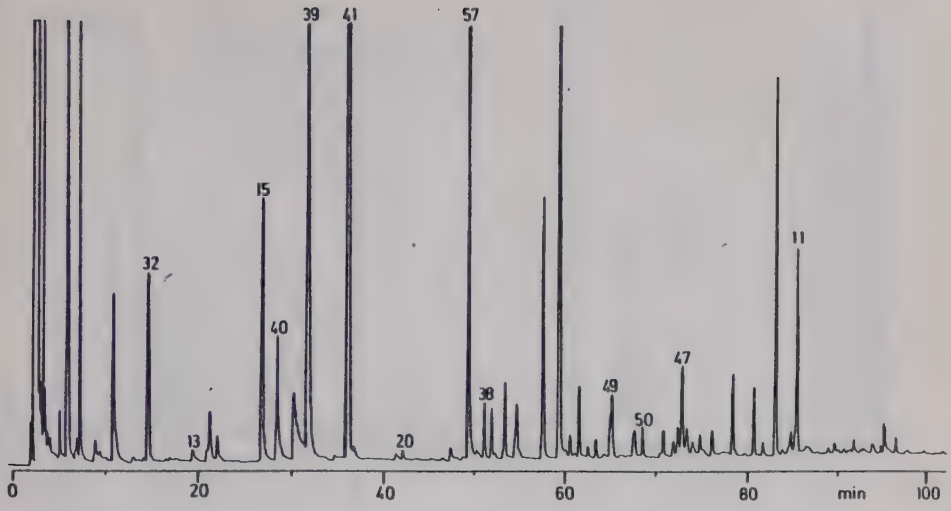


Abb. 41: Gaschromatogramm von Galle eines Patienten mit Gallengangsverschluß. Dünnschichtchromatographiezone 2B. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 7.

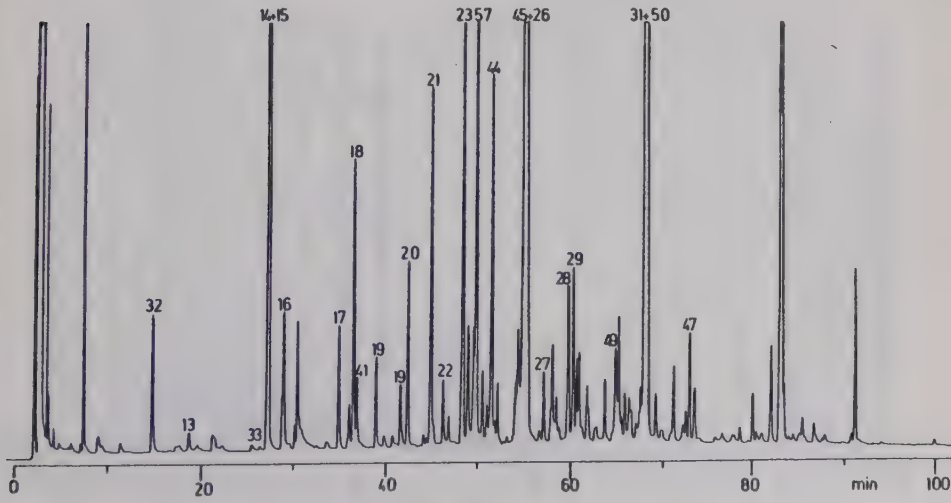


Abb. 42: Gaschromatogramm von Urin eines Patienten mit Gallengangsverschluß. Dünnschichtchromatographiezone 2B. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 7.

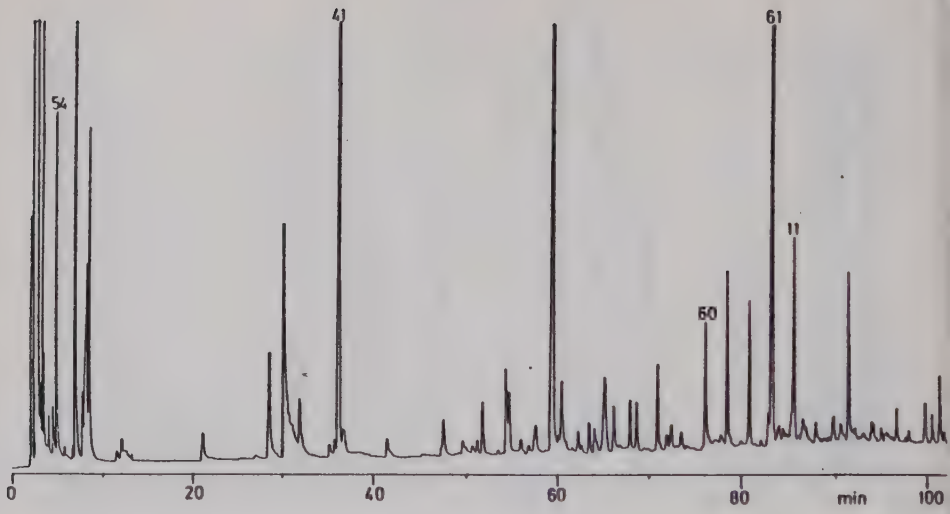


Abb. 43: Gaschromatogramm von Galle eines Patienten mit Gallengangsverschluß. Dünnschichtchromatographiezone 3. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 7.

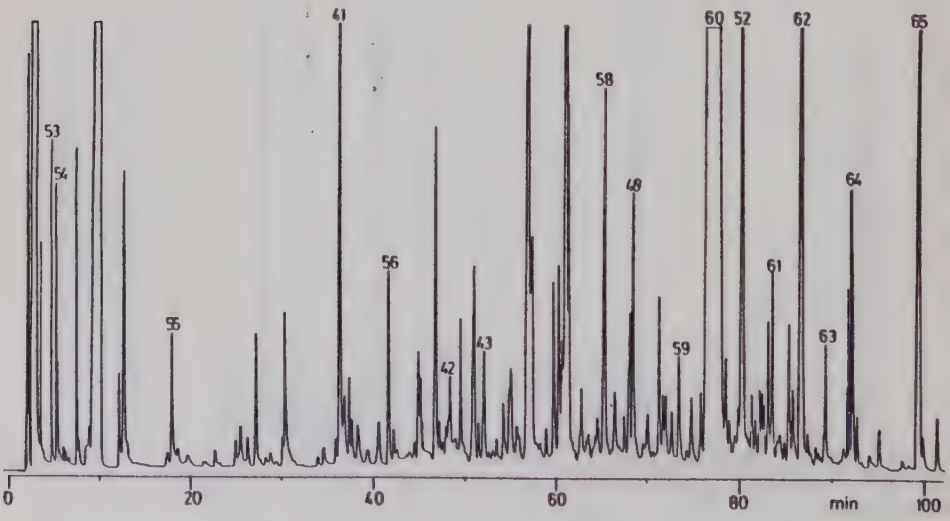


Abb. 44: Gaschromatogramm von Urin eines Patienten mit Gallengangsverschluß. Dünnschichtchromatographiezone 3. Bezeichnung der Peaks nach Tab. 7.

Tabelle 7: Organische Säuren in Urin und Galle bei Verschluß des Gallengangs.
++ hohe Konzentration
+ vorhanden
- fehlend

Nr.	Substanz	Galle	Urin
1	Laurinsäure	+	-
2	Myristinsäure	+	+
3	Pentadecansäure	+	-
4	Palmitoleinsäure	+	-
5	Palmitinsäure	++	+
6	Anteisomargarinsäure	+	-
7	Margarinsäure	+	-
8	Linolensäure	+	-
9	Linolsäure	++	+
10	Ölsäure	++	+
11	Stearinsäure	+	+
12	Arachidonsäure	+	-
13	Malonsäure	+	+
14	Ethylmalonsäure	-	+
15	Bernsteinsäure	+	+
16	Methylbernsteinsäure	-	+
17	Glutarsäure	-	+
18	3-Methylglutarsäure	-	+
19	3-Methylglutaconsäure	-	+
20	Adipinsäure	+	+
21	3-Methyladipinsäure	-	+
22	Muconsäure	-	+
23	3,4-Methylenadipinsäure (9)	-	+
24	Pimelinsäure	-	+
25	3-Methylpimelinsäure	-	+
26	Korksäure	-	+
27	3-Methylkorksäure	-	+
28	3,4-Methylenkorksäure (9)	-	+
29	Azelainsäure	-	+

Tabelle 7: Fortsetzung

Nr.	Substanz	Galle	Urin
30	3-Methylazelainsäure	-	+
31	5,6-Decindisäure (10)	-	+
32	Brenztraubensäure	++	+
33	3-Oxobuttersäure	-	+
34	2-Oxoisovaleriansäure	+	-
35	2-Oxo-3-methylvaleriansäure	+	-
36	2-Oxoisocapronsäure	++	+
37	2-Ethyl-3-oxohexansäure	-	+
38	2-Oxoglutarsäure	+	+
39	Phenol	+	-
40	Benzoesäure	+	+
41	Phenylessigsäure	+	+
42	Mandelsäure	-	+
43	Phenylmilchsäure	-	+
44	4-Methoxybenzoesäure	+	+
45	2-Methoxyphenylessigsäure	+	+
46	4-Methoxyphenylessigsäure	+	+
47	4-Methoxyphenylbrenztraubensäure	+	+
48	4-Methoxyphenylmilchsäure	-	+
49	3,4-Dimethoxybenzoesäure	+	+
50	3,4-Dimethoxyphenylessigsäure	-	++
51	3,4-Dimethoxyphenylpropionsäure	-	+
52	3,4-Dimethoxyphenylmilchsäure	-	+
53	Glycollsäure	-	+
54	Milchsäure	+	+
55	3-Hydroxyisobuttersäure (11)	-	+
56	3-Hydroxy-3-methylglutarsäure	-	+
57	Anthranilsäure	+	+
58	Furoylglycin (11)	-	+
59	Picolinylglycin (11)	-	+
60	Hippursäure	-	+

Tabelle 7: Fortsetzung

Nr.	Substanz	Galle	Urin
61	Indolessigsäure	++	+
62	2-Methoxyhippursäure	-	++
63	3-Methoxyhippursäure	-	+
64	4-Methoxyhippursäure	-	+
65	Phenacetylglutaminsäure (11)	-	+

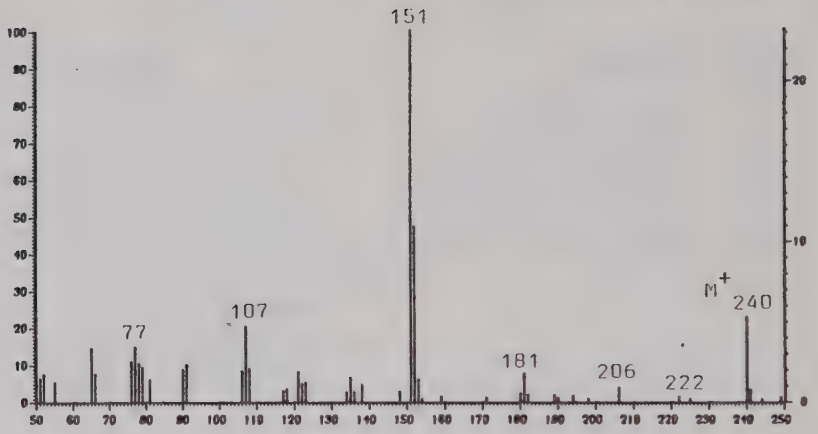
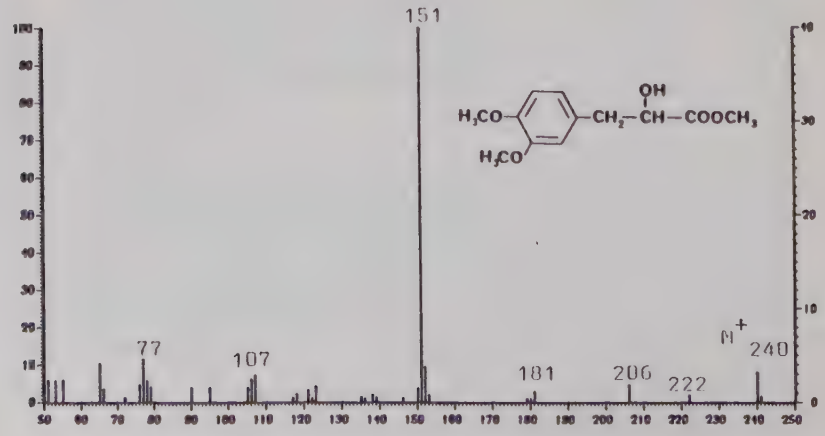


Abb. 45: Massenspektrum einer unbekannten Substanz aus Urin

Abb. 46: Massenspektrum des 3,4-Dimethoxyphenylmilchsäure-methylesters.



IV. DISKUSSION

4.1. Organische Säuren im Urin - pathophysiologische Bedeutung

Die quantitative Bestimmung der organischen Säuren im Urin ist die Methode der Wahl zur Diagnose von angeborenen Stoffwechselstörungen im Intermediärstoffwechsel, die auf einem Enzymdefekt beruhen (13), wie z.B. die Homocystinurie, Ahornsirup-Erkrankung, Phenylketonurie oder Methylmalonacidurie. Bei diesen Erkrankungen kommt es durch einen Überlaufmechanismus zu einem erheblichen Konzentrationsanstieg der vor dem metabolischen Block gelegenen Substanzen in Serum und Urin (14). Auch bei Stoffwechselentgleisungen in Folge anderer Erkrankungen, die man unter dem Begriff metabolische Acidosen zusammenfaßt, finden sich charakteristische Veränderungen im Profil der organischen Säuren des Urins (4), z.B. bei der Ketoacidose oder Lactatacidose. Da die biochemische Kapazität der einzelnen Organe verschieden ist, laufen im Organismus eine Reihe von Reaktionszyklen ab, deren einziger Zweck es ist für einen Substratfluß von Organ zu Organ zu sorgen, z.B. der Cori-Zyklus (15). Eine erhebliche Funktionseinschränkung eines Organs hat daher stets Auswirkungen auf den Stoffwechsel des gesamten Organismus. Die organischen Säuren des Urins, die die Stoffwechselaktivität des gesamten Organismus wiederspiegeln, sollten daher bei isolierten Störungen einzelner Organe charakteristische Veränderungen zeigen.

Für exakte Stoffwechselbilanzuntersuchungen ist es nötig, die Analyse der organischen Säuren im Urin als quantitative Bestimmung durchzuführen. Die quantitative Bestimmung verschiedener Substanzen in einer gaschromatographischen Profilanalyse ist zwar technisch möglich (durch Mitführen

eines geeigneten Internen Standards), jedoch aufwendig und auf eine Standardisierung der Urinproben angewiesen (24-Stunden-Sammelurin oder Korrektur über den Creatiningehalt der Probe). Grobe Stoffwechselstörungen lassen sich jedoch auch aus dem Konzentrationsverhältnis der normalerweise im Profil der organischen Säuren vorkommenden Substanzen zueinander diagnostizieren. Hierzu ist nicht einmal die Analyse einer standardisierten Urinprobe nötig. Dies macht die Bestimmung der organischen Säuren des Urins, wenn man sie als Screeningmethode anwendet, zu einem wertvollen diagnostischen Hilfsmittel.

4.2. Organische Säuren im Urin bei Störung der Leberfunktion Diskussion der Ergebnisse

In den Urinproben aller Patienten mit Leberfunktionsstörungen fand sich eine hohe Konzentration der Bernsteinsäure. Bernsteinsäure kann im Organismus auf mehreren Wegen entstehen:

- als Endprodukt sukzessiver ß-Oxidation langkettiger Dicarbonsäuren
- durch Carboxylierung und Isomerisierung von Propionsäure, die beim Abbau der ungeradzahligen und methylverzweigten Fettsäuren, sowie der verzweigkettigen Aminosäuren Valin und Isoleucin entsteht
- als Endprodukt des Stoffwechsels anaerober Bakterien im Darm, die neben Bernsteinsäuren andere kurzkettige Carbonsäuren produzieren (16).

Eine signifikante Erhöhung der Bernsteinsäure im Urin findet man auch bei der Ketoacidose (17,18). Die Bernsteinsäure bei der Ketoacidose entstammt wahrscheinlich dem vermehrten Abbau von Dicarbonsäuren, die bei der Aktivierung der Lipolyse, wie sie für die Ketoacidose charakteristisch ist, in hoher Konzentration in Serum und Urin auftreten. Bei Störungen der Leberfunktion beruht die erhöhte Bernsteinsäurekonzentration im Urin vermutlich nicht auf diesem Mechanismus.

Es ist wahrscheinlicher, daß die Bernsteinsäure im Stoffwechsel anaerober Bakterien des Darms entspringt und unter Umgehung der Leber durch Porto-Cavale Anastomosen in den Urin gelangt. Eine weitere Quelle der erhöhten Bernsteinsäurekonzentration im Urin dürfte eine Störung des Leberstoffwechsels selbst sein. Die Bernsteinsäure entstammt hierbei dem Stoffwechsel extrahepatischer Gewebe, die dieses Molekül in die Blutbahn abgeben, damit es in der Leber zu Glucose resynthetisiert werden kann, analog dem Cori-Zyklus. Bei schwerer Beeinträchtigung des Leberstoffwechsels wird der Cori-Zyklus unterbrochen und es kommt zu sogenannten B-Lactatacidosen (19). Möglicherweise reagiert die Bernsteinsäure hier noch empfindlicher als das Lactat, weil eine ausgeprägte Lactatacidose bei keinem Patienten nachgewiesen werden konnte.

Störungen im Fettsäurestoffwechsel sind ebenfalls bei Lebererkrankungen beschrieben. Die Konzentration der freien Fettsäuren im Serum insgesamt nimmt zu, wobei der Konzentrationsanstieg von der Schwere der Lebererkrankung abhängig ist. Im Verteilungsmuster der Serumfettsäuren finden sich charakteristische Unterschiede: die Konzentration der mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolensäure und Arachidonsäure nimmt ab, während die Konzentration der einfach ungesättigten Fettsäuren Ölsäure und Palmitoleinsäure entsprechend zunimmt. Dies liegt wahrscheinlich am gestörten Fettsäure-Biosynthese-Stoffwechsel der Leber (20). Die freien Fettsäuren des Serums treten nur in außerordentlich geringer Menge in den Urin über; deswegen fanden sich entsprechende Veränderungen bei den Fettsäuren des Urins nicht.

Besonders eindrucksvolle Unterschiede ergaben sich bei den aromatischen Carbonsäuren zwischen den Urinproben Gesunder und Patienten mit Lebererkrankungen. Die Konzentration einiger aromatischer Carbonsäuren (z.B. der

4-Hydroxyphenylessigsäure) nimmt im ein Vielfaches zu; andere aromatische Carbonsäuren findet man mit dieser Methode bei Gesunden überhaupt nicht im Urin (z.B. die 4-Hydroxymandelsäure). D.Mütting und Mitarbeiter (21) haben in einer Studie 600 Serum- und Urinproben von Patienten mit Lebererkrankungen auf "freie Phenole" untersucht. Sie bedienten sich hierzu einer kolorimetrischen Methode, wobei sie zusätzlich eine dünnschichtchromatographische Differenzierung in die verschiedenen Phenol-Carbonsäuren durchführten. In dieser Studie fand sich bei Patienten mit Leberzirrhose und Pfortaderhochdruck ein signifikanter Anstieg der 4-Hydroxyphenylessigsäure. Bei Patienten im Leberkoma stieg zusätzlich die 4-Hydroxyphenylmilchsäure stark an. Gleichzeitig fanden sich im Urin auch große Mengen an freiem (nicht glucuronidiertem) Phenol und p-Kresol. Obwohl die von den Autoren verwendete Analysenmethodik heute veraltet ist, können die Ergebnisse durch die gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchungen nur bestätigt werden. Durch Papierchromatographie konnten indische Autoren auch bei der Leberzirrhose des Kindes einen signifikanten Anstieg der 4-Hydroxyphenylessigsäure und der 4-Hydroxyphenylmilchsäure nachweisen (22).
Der Stoffwechsel von Tyrosin bei der Leberzirrhose wurde von B.M. Nordlinger und Mitarbeitern (23) untersucht. Die Autoren führten orale Tyrosinbelastungstests durch und konnten feststellen, daß der normale Abbau des Tyrosins über 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und Homogentisinsäure beeinträchtigt ist, so daß es zu einer vermehrten Produktion anderer aromatischer Carbonsäuren als Abbauprodukte des Tyrosins kommt. Die Autoren machten hierfür drei Faktoren verantwortlich:

- die reduzierte Abbaukapazität der Leber
- die Abbaureaktionen extrahepatischer Gewebe

- die Abbaureaktionen von Mikroorganismen im Darm, deren Produkte durch Porto-Cavale Anastomosen in den Urin gelangen (unter Umgehung der Leber).

Dies wird durch die gaschromatographisch-massenspektrometrischen Untersuchungen im Urin bestätigt. Nicht nur die Konzentration derjenigen aromatischen Carbonsäuren, die in einem direkten Zusammenhang mit dem Tyrosinabbau stehen (4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, 4-Hydroxyphenylmilchsäure, 4-Hydroxyphenylessigsäure), ist im Urin erhöht, sondern auch die Konzentration von solchen aromatischen Carbonsäuren, deren Entstehung nur durch bakteriellen Abbau von Tyrosin erklärbar ist (4-Hydroxybenzoesäure, p-Kresol, Phenol) (24). 4-Hydroxymandelsäure, sowie die 3-Methoxy-4-hydroxyphenylessigsäure, deren Konzentration ebenfalls im Urin erhöht ist, spiegeln die Aktivität extrahepatischer Gewebe wieder. Diese Verbindungen werden in bedeutend niedrigerer Konzentration auch um Urin des Gesunden gefunden (z.T. unterhalb der Nachweisgrenze). Sie sind Abbauprodukte von Neurotransmittern (Dopamin und Octopamin), die bei vermehrtem Übertritt von Tyrosin ins Gehirn gebildet werden. Der vermehrte Übertritt von Tyrosin ins Gehirn ist durch die hohe Plasmakonzentration dieser Aminosäure bedingt, wie man sie typischerweise bei Leberstoffwechselstörungen findet. In der Bildung von falschen Neurotransmittern im Gehirn wird die Ursache der hepatischen Encephalopathie gesehen (25).

In einem Experiment an Hunden konnte gezeigt werden, daß allein die Anlage eines Porto-Cavalen Shunts ohne Zerstörung von funktionsfähigem Lebergewebe zu einem protrahierten Anstieg von sauren Tyrosinstoffwechselprodukten im Blut führt (26). Dies läßt sich auch an den Urinproben des Patienten mit der Porto-Cavalen Shunt-Operation verfolgen. Nach Wiederaufnahme der oralen Ernährung kommt es zu einem zunehmenden Anstieg der aroma-

tischen Carbonsäuren im Urin des Patienten. Der passagere Anstieg der Oxocarbonsäuren und Hydroxycarbonsäuren am zweiten postoperativen Tag dürfte durch die parenterale Ernährung mit Aminosäuregemischen bedingt sein; dies wurde auch im Urin der Patientinnen mit akutem Leberversagen beobachtet, die ebenfalls parenteral ernährt wurden. Die einfachen Oxocarbonsäuren (Brenztraubensäure, 2-Oxoisovaleriansäure, 2-Oxo-3-methylvaleriansäure und 2-Oxoisocapronsäure) stehen mit den entsprechenden Aminosäuren (Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin) durch Transaminierung im Gleichgewicht. Im Urin findet man normalerweise nur geringe Mengen dieser Oxocarbonsäuren (27).

Die Bedeutung Porto-Cavaler Anastomosen wird auch durch das Experiment mit der enzymatischen Hydrolyse von Glucuronsäure- und Schwefelsäure-Konjugaten unterstrichen. Im Urin des Gesunden steigt die Konzentration von typischen Produkten bakterieller Zersetzung von Aminosäuren im Darm, wie z.B. Phenol, p-Kresol und Indolessigsäure nach enzymatischer Hydrolyse stark an. Dies zeigt, daß die gesunde Leber diese Produkte normalerweise mit hoher Effizienz in wasserlösliche Derivate überführt, die mit dem Harn über die Niere ausgeschieden werden. Beim Vorhandensein Porto-Cavaler Anastomosen gelangt ein erheblicher Teil dieser Moleküle unter Umgehung der Leber (d.h. unkonjugiert) in den allgemeinen Kreislauf, von wo er auch in den Urin gerät. Man findet daher im Urin von Patienten mit Leberzirrhose Phenol, p-Kresol und Indolessigsäure in wesentlich höherer Konzentration, als bei Gesunden. Da diese Moleküle überwiegend unkonjugiert vorliegen steigt deren Konzentration nach enzymatischer Hydrolyse nicht weiter an.

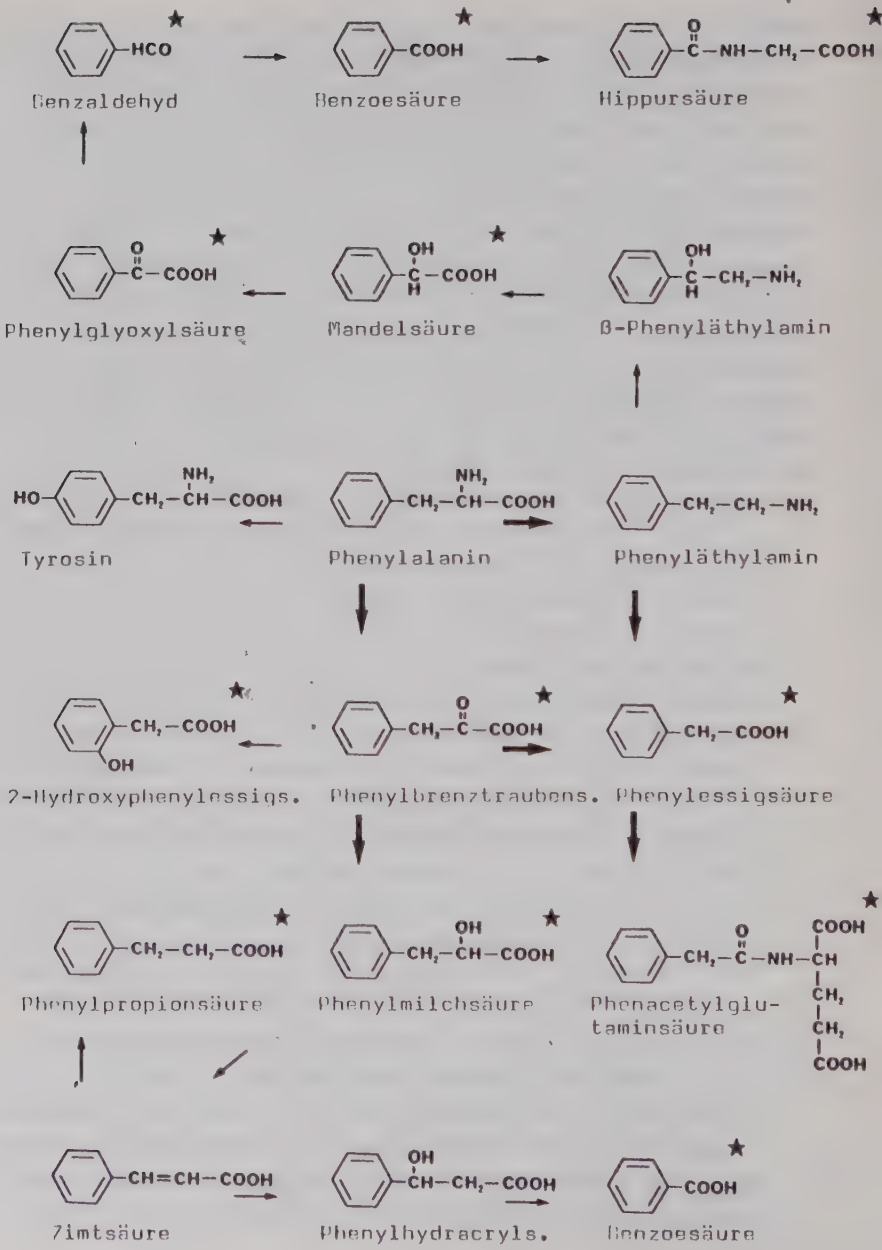
Die Entgiftungsreaktionen der Leber werden auch bei schwerster Leberfunktionsstörung nur wenig beeinträchtigt; im Gegenteil es kommt zu einer Enzyminduktion, so daß erst bei nahezu vollständigem Leberausfall entsprechende Veränderungen auftreten (28). Störungen im Arzneimittelstoffwechsel lassen sich bei Leberfunktionsstörungen nur mit subtilen Methoden messen (z.B. Antipyrin-Clearance). Daß die Entgiftungsleistungen der Leber auch bei schwerster Zerstörung des Órgans lange unbeeinträchtigt bleiben, zeigt sich am Persistieren der Hippursäureausscheidung bei der Patientin mit der Knollenblätterpilzintoxikation; Hippursäure bleibt bis zum Eintritt des Todes im Urin nachweisbar.

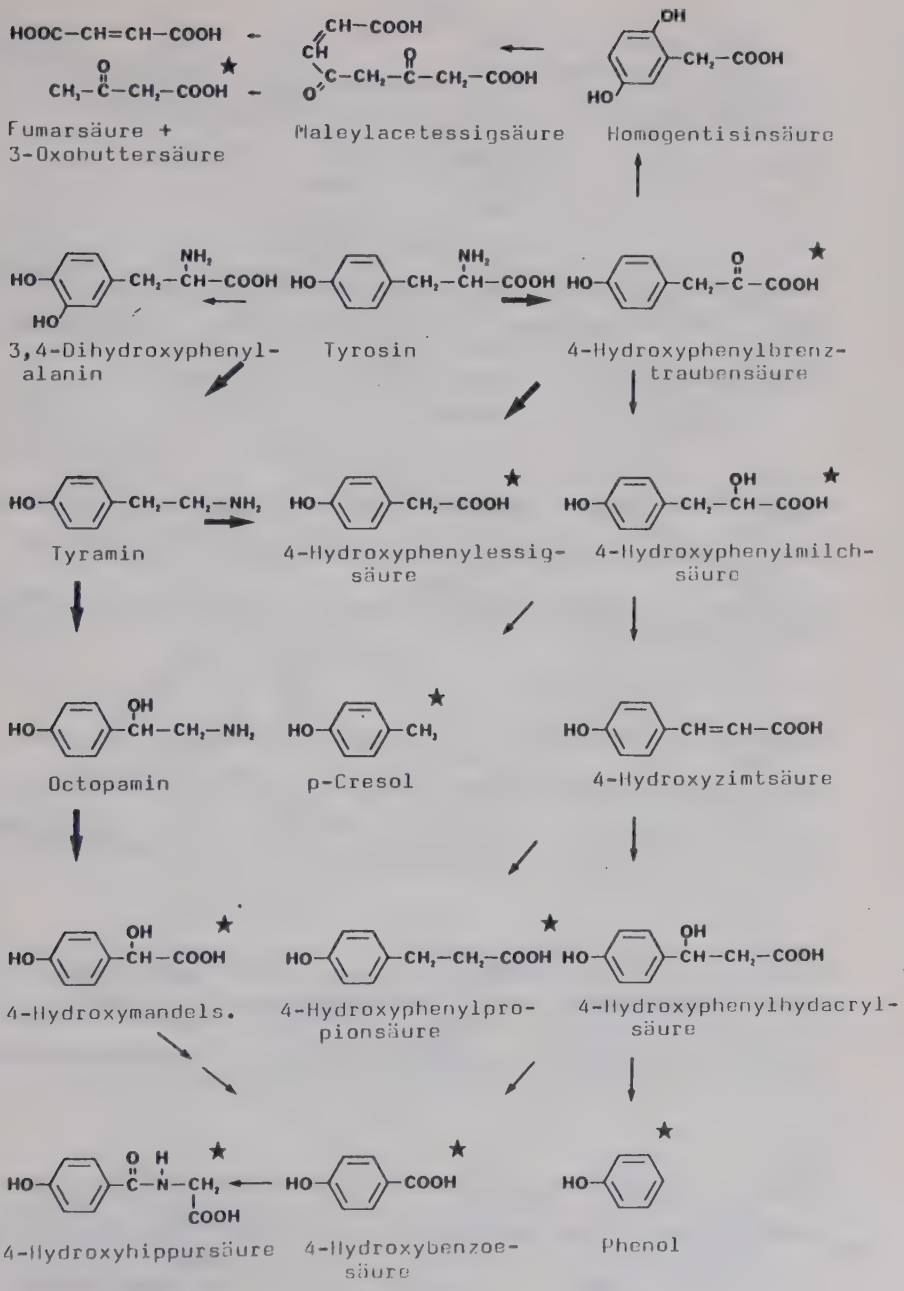
Das Experiment mit dem Deuterium-markierten Diazomethan zeigt, daß die überwiegende Anzahl der aromatischen Carbonsäuren des Urins tatsächlich dem Stoffwechsel des Tyrosins entstammt. Methylphenylether von aromatischen Carbonsäuren wie sie für die meisten pflanzlichen Inhaltstoffe, die mit der Nahrung aufgenommen werden,typisch sind, treten mit Ausnahme der 3,4-Dimethoxybenzoesäure nicht auf. Vor allem war das Experiment sehr hilfreich zur Kontrolle der bisher massenspektrometrisch identifizierten Verbindungen. Artefakte durch die verwendeten Reagenzien konnten ausgeschlossen werden. Dies sei an einem Beispiel verdeutlicht: Im Urin findet man einige Cyclopropan-Carbonsäuren, z.B. die 3,4-Methylenadipinsäure (9). Der Cyclopropanring dieser Säure könnte auch als Artefakt durch die Reaktion von Diazomethan mit einer Doppelbindung entstanden sein. Daß dies nicht der Fall ist, konnte durch das Experiment mit dem Deuterium-markierten Diazomethan bewiesen werden.

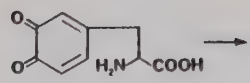
Das Experiment, in dem Galle und Urin eines Patienten gleichzeitig analysiert wurden, zeigt einige interessante Aspekte des Leberstoffwechsels. Das Profil der organischen Säuren in der Galle entspricht in etwa dem Profil, das man bei Analyse der organischen Säuren des Serums erhält (4). Überraschend waren die hohen Konzentrationen an freiem Phenol und Indolessigsäure. Möglicherweise werden diese Moleküle als Konjugate in die Galle ausgeschieden, werden sekundär dekonjugiert und sind dann über die normale Analyse nachweisbar. Gallensäuren lassen sich mit der hier verwendeten Analysenmethode nicht nachweisen. Im Urin des Patienten befanden sich relativ hohe Konzentrationen an Bernsteinsäure und aromatischen Carbonsäuren, jedoch nicht so hoch wie bei typischer Leberzirrhose. Zwei Substanzen wurden im Urin des Patienten mit Gallengangsverschluß im Vergleich zu Gesunden in außerordentlich hoher Konzentration gefunden: die 2-Methoxyhippursäure und die 3,4-Dimethoxyphenylmilchsäure. Da es keinen Grund gibt anzunehmen, daß ein Gallengangsverschluß zu einem selektiven Anstieg dieser beiden Carbonsäuren im Urin führt, muß man eine exogene Ursache hierfür vermuten. 2-Methoxyhippursäure ist ein typisches Abbauprodukt der Acetylsalicylsäure (Aspirin), 3,4-Dimethoxyphenylmilchsäure ist ein Abbauprodukt von L-Dopa, welches bei Morbus Parkinson gegeben wird. Inwieweit der Patient diese beiden Medikamente erhalten hat, läßt sich retrospektiv nicht mehr feststellen, es ist aber wahrscheinlich.

Der Stoffwechsel aromatischer und heterozyklischer Aminosäuren ist bei Störung der Leberfunktion am meisten beeinträchtigt; die Leber ist das einzige Organ, in dem diese Substanzen vollständig abgebaut werden können. Die aromatischen und heterozyklischen Aminosäuren können aber auch durch die Mikroorganismen des Darms abgebaut werden. Diese

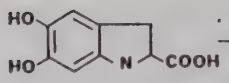
sind zum Teil zu Reaktionen in der Lage über die der menschliche Organismus nicht verfügt; Enterobacteriaceae können zum Beispiel die Seitenkette des Tryptophans unter Produktion von Indol abbauen (29). Die Synthese von Phenol und p-Kresol durch Mikroorganismen des Darms erfolgt durch ähnliche Mechanismen (24). In den nachfolgenden Formelschemata wurde versucht die Stoffwechselwege von Phenylalanin, Tyrosin un Tryptophan so wie sie bei Menschen und in den Mikroorganismen des Darms ablaufen darzustellen. Die Stärke der Pfeile soll zeigen, welche Stoffwechselwege bei Lebererkrankungen vermehrt beschritten werden. Diejenigen organischen Säuren, die bei gaschromatographisch-massenspektrometrischer Analyse im Urin gefunden wurden, sind durch einen Stern markiert.


Benzaldehyd
Benzoesäure
Hippursäure
Phenylglyoxylsäure
Mandelsäure
ß-Phenyläthylamin
Tyrosin
Phenylalanin
Phenyläthylamin
2-Hydroxyphenylessigs.
Phenylbrenztraubens.
Phenylessigsäure
Phenylpropionsäure
Phenylmilchsäure
Phenacetylglu-
taminsäure
Zimtsäure
Phenylhydracryls.
Benzoesäure

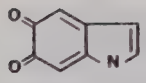

Fumarsäure +
3-Oxobuttersäure
Maleylacetessigsäure
Homogentisinsäure
3,4-Dihydroxyphenyl-
alanin
Tyrosin
4-Hydroxyphenylbrenz-
traubensäure
Tyramin
4-Hydroxyphenylessig-
säure
4-Hydroxyphenylmilch-
säure
Octopamin
p-Cresol
4-Hydroxyzimtsäure
4-Hydroxymandels.
4-Hydroxyphenylpro-
pionsäure
4-Hydroxyphenylhydacryl-
säure
4-Hydroxyhippursäure
4-Hydroxybenzoe-
säure
Phenol



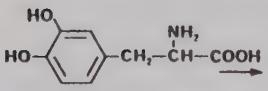
Dopa-Chinon



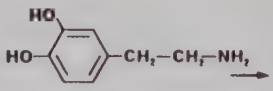
2-Carboxy-2,3-di hydro-5,6-dihydroxy--indol



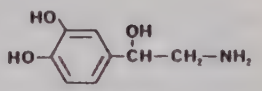
Melanin



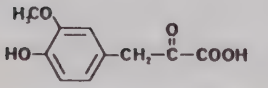
3,4-Dihydroxyphenyl-alanin



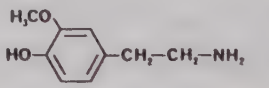
Dopamin



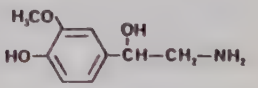
Noradrenalin



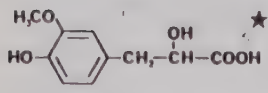
3-Methoxy-4-hydroxy-phenylbrenztraubens.



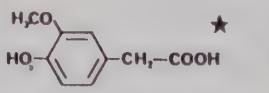
3-Methoxydopamin



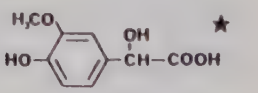
3-Methoxynoradrenalin



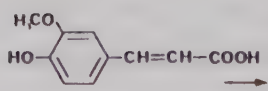
3-Methoxy-4-hydroxy-milchsäure



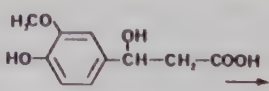
3-Methoxy-4-hydroxy-phenylessigsäure



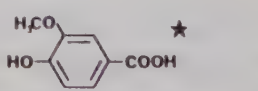
3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure



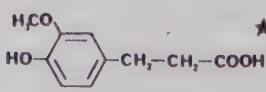
3-Methoxy-4-hydroxy-zimtsäure



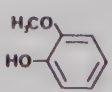
3-Methoxy-4-hydroxy-phenylhydracryls.



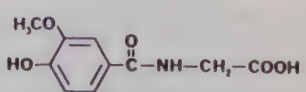
3-Methoxy-4-hydroxy-benzoesäure



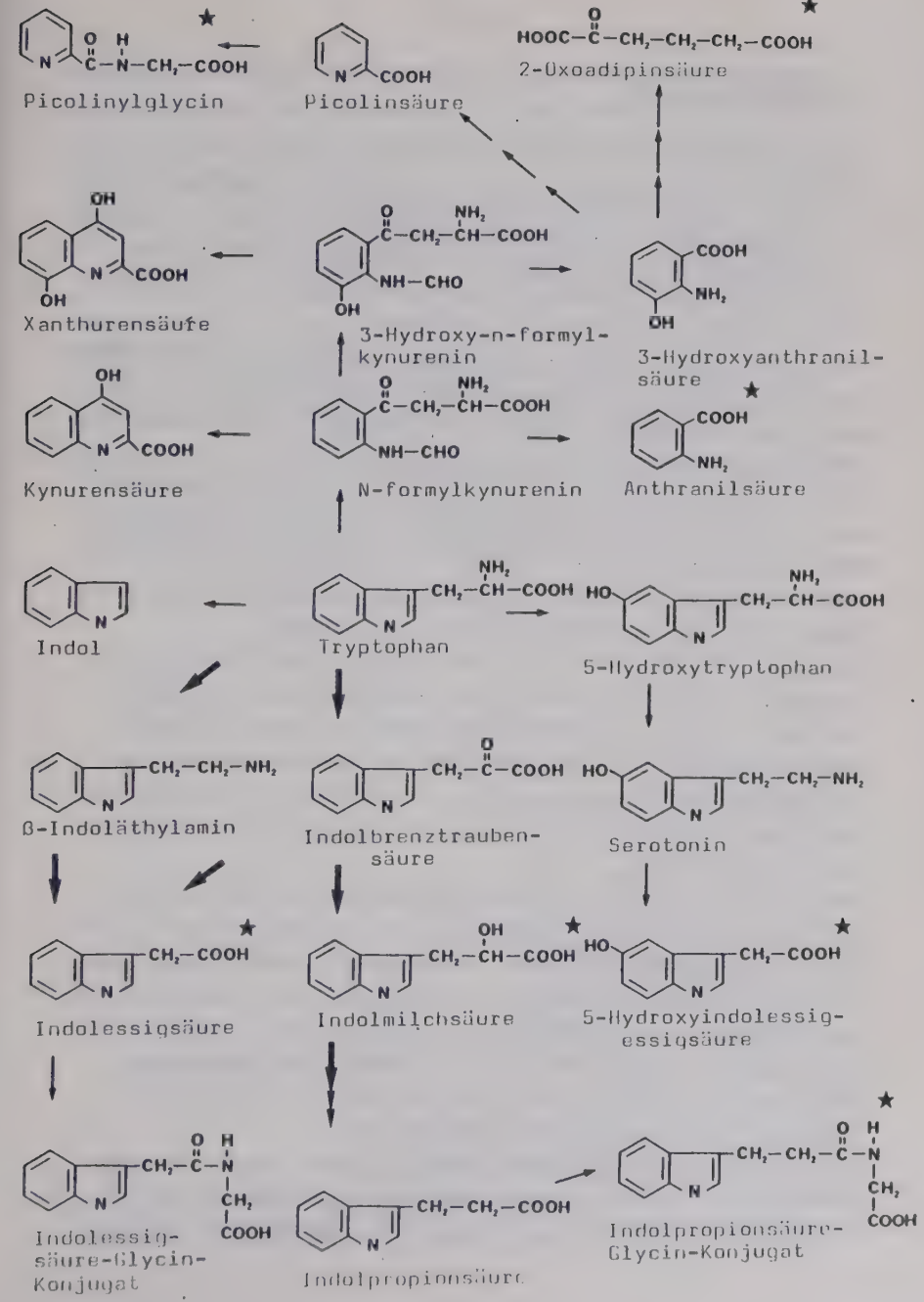
3-Methoxy-4-hydroxy-phenylpropionsäure



Gujacol



3-Methoxy-4-hydroxy-hippursäure


Picolinylglycin
Picolinsäure
2-Oxoadipinsäure
Xanthurensäure
3-Hydroxy-n-formyl-kynurenin
3-Hydroxyanthranil-säure
Kynurensäure
N-formylkynurenin
Anthranilsäure
Indol
Tryptophan
5-Hydroxytryptophan
ß-Indoläthylamin
Indolbrenztrauben-säure
Serotonin
Indolessigsäure
Indolmilchsäure
5-Hydroxyindolessig-essigsäure
Indolessig-säure-Glycin-Konjugat
Indolpropionsäure
Indolpropionsäure-Glycin-Konjugat

V. ZUSAMMENFASSUNG

Organische Säuren wurden in Urinproben von sieben Patienten mit Leberzirrhose analysiert. Im Vergleich zu Gesunden fand sich eine erhöhte Ausscheidung der Bernsteinsäure und mehrerer aromatischer Carbonsäuren (4-Hydroxyphenylessigsäure, 4-Hydroxyphenylmilchsäure, 4-Hydroxymandelsäure, 4-Hydroxyhippursäure). Die Ausscheidungserhöhung war am auffälligsten bei einem Patienten,der postoperativ nach Porto-Cavaler Shunt-Operation langsam wieder mit Eiweiß ernährt wurde. Die aromatischen Carbonsäuren, deren Ausscheidung bei Leberzirrhose erhöht war, liegen als freie Phenolcarbonsäuren im Urin vor; damit ist ihre Entstehung aus Tyrosin wahrscheinlich. Im Urin von Patienten mit Leberzirrhose fanden sich hohe Konzentrationen von Phenolen (Phenol und p-Kresol). Im Urin des Gesunden sind Phenole nur nach enzymatischer Glucuronsäure- und Schwefelsäure-Spaltung nachweisbar.

Bei zwei Patientinnen mit akutem Leberversagen (nach Vergiftung) fanden sich außer einem möglicherweise therapiebedingten Anstieg der Oxocarbonsäuren nur uncharakteristische Veränderungen. Die Hippursäureausscheidung war bis in das Finalstadium nachweisbar, was zeigt, daß dieser Entgiftungsmechanismus auch bei nahezu völligem Leberversagen noch funktioniert.

Bei einem Patienten mit Gallengangsverschluß wurden Urin und Galle gleichzeitig analysiert. In der Galle fanden sich nur wenige organische Säuren (hauptsächlich Fettsäuren,sowie Phenol und Indolessigsäure). Im Urin fand sich eine diskrete Erhöhung der Bernsteinsäure sowie mehrerer aromatischer Carbonsäuren, jedoch kein Phenol. Phenol und Indolessigsäure werden möglicherweise als Konjugat in die Galle sezerniert und dort sekundär dekonjugiert.

Die Analyse der organischen Säuren im Urin zeigt, daß bei Untergang von aktivem Leberparenchym (weniger) und bei Eröffnung Porto-Cavaler Anastomosen (hauptsächlich), die Aus-

scheidung von aromatischen Carbonsäuren, die mit dem Tyrosinstoffwechsel in Zusammenhang stehen, ansteigt. Das Profil der auftretenden Metaboliten macht drei Mechanismen hierfür wahrscheinlich:

- vermehrter Abbau von Tyrosin durch extrahepatische Gewebe zu Metaboliten, die normalerweise nur in geringer Menge gebildet werden (z.B. 4-Hydroxyphenylmilchsäure).

- vermehrte Umwandlung von Tyrosin in Neurotransmitter und neurotransmitterähnliche Substanzen mit Ausscheidung der entsprechenden Metaboliten (z.B. 4-Hydroxymandelsäure).

- Eröffnung Porto-Cavaler Anastomosen, durch die Produkte bakteriellen Abbaus von Tyrosin im Darm unter Umgehung der Leber in den Körper gelangen (z.B. p-Kresol).

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1 Wissenschaftliche Tabellen Geigy
Ciba-Geigy AG
8. Aufl., Basel 1977

2 Karlson, P., Gerok,W., Groß,W.
Pathobiochemie
1. Aufl., Thieme, Stuttgart 1978

3 Jellum, E.
Profiling of Human Body Fluids in Healthy and Diseased States Using Gaschromatography and Mass Spectrometry, with Special Reference to Organic Acids.
J. Chromatogr. 143 (1977) 427-462

4 Pickert, A.
Untersuchung der organischen Säuren in Serum und Urin bei Stoffwechselgesunden und Patienten mit Acidosen. Entwicklung und Anwendung von Gaschromatographisch-Massenspektrometrischen Methoden und Auswerteverfahren, Substanzsynthesen, Fragmentierungsuntersuchungen.
Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Tübingen. In Vorbereitung.

5 Organikum
11. Aufl., VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1972, S. 598 ff.

6 " Diazald " und " Deutero-Diazald Prep Set "
Technische Merkblätter von
EGA Chemie (Steinheim)

7 Curtius, H.Ch., Roth, M.
Clinical Biochemistry
1. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin 1974

8 Budzikiewicz, H.
Massenspektrometrie
1. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1972

9 Greter, J., Lindstedt, S., Steen, G.
Urinary Metabolites of Cis-9,10-Methylene Octadecanoic Acid
J. biol. Chem. 254 (1979) 2807-2813

10 Lindstedt, S., Steen, G.
5-Decynedioic Acid, an Acetylenic Compound in Human Urin
Clin. Chem. 21 (1975) 1964-1969

11 Spiteller, M., Spiteller, G.
Trennung und Charakterisierung saurer Harnbestandteile
J. Chromatogr. 164 (1979) 253-317

12 Grupe, A., Spiteller, G.
New Polar Acid Metabolites in Human Urin
J. Chromatogr. 226 (1981) 301-314

13 Feer, E., Joppich, G., Schulte, F.J.
Lehrbuch der Kinderheilkunde
24. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1980

14 Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.F.
The Metabolic Basis of Inherited Disease
McGraw Hill, New York 1972

15 Harper, H.A., Löffler, G., Petrides, P., Weiss, L.
Physiologische Chemie
1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1975

16 Wiesmann, E.
Medizinische Mikrobiologie
4. Aufl., Thieme, Stuttgart 1978

17 Stierle, U.
Methodik zur qualitativen Analyse organischer Säuren im Urin und Serum mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Dicarbonsäuren im Urin bei Stoffwechselgesunden und Patienten mit Ketoacidose.
Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Tübingen, 1981

18 Liebich, H.M., Pickert, A., Stierle, U., Wöll, J.
Gas Chromatography-Mass Spectrometry of Saturated and Unsaturated Dicarboxylic Acids in Urine.
J. Chromatogr. 199 (1980) 181-189

19 Woods, H.F., Connor, H.
The Role of Liver Dysfunction in the Genesis of Lactic Acidosis.
in Lactat in Acute Conditions.
Int. Symp., Basel 1978, S. 102-114
Karger, Basel 1979

20 Wilcox, H.G., Dunn, G.D., Schenker, S.
Plasma Long Chain Fatty Acids and Esterified Lipids in Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy
Amer. J. Med. Sci. 276 (1978) 293-303

21 Müting, D., Kraus, W., Stumpf, U., Deesz, H., Keller, H.E.
Die klinische Bedeutung der freien Phenole bei Leberkrankheiten
Med. Welt 22 (1971) 368-372

22 Saini, A.S., Dhatt, P.S., Mehta, H.C., Sood, S.C., Singh, H.
Urinary Phenolic Acids in Indian Childhood Cirrhosis and Portal Cirrhosis
Indian Pediat. 15 (1978) 319-325

23 Nordlinger, B.M., Fulenwider, J.T., Ivey, G.L., Faraj, B.A., Ali, F.M., Kutner, M., Henderson, J.M., Rudman, D.
Tyrosine Metabolism in Cirrhosis
J. Lab. Clin. Med. 94 (1979) 832-840

24 Curtius, H.Ch., Mettler, M., Ettlinger, L.
Study of the Intestinal Tyrosine Metabolism Using Stable Isotopes and Gas Chromatography-Mass Spektrometry
J. Chromatogr. 126 (1976) 569-580

25 Fischer, J.E., Baldessarini, R.J.
Pathogenesis and Therapy of Hepatic Coma
in Progress in Liver Disease V, Hrsg. Popper, H., Schaffner, F
Grune & Sratton, New York 1976, S. 363-397

26 Ali, F.M., Ansley, J., Faraj, B.A.
Studies of the Influence of Portocaval Shunt on the Metabolism of Tyrosine
J. Pharmacol. Exp. Ther. 214 (1980) 546-553

27 Liebich, H.M., Pickert, A., Wöll, J.
Analysis of the Oxocarboxylic Acid Fraction in Serum and Urine as O-Methyloximes by Thermionic Spedific Detection
J.Chromatogr. 217 (1981) 255-262

28 Greim, H., Remmer, H.
Störungen der Entgiftung
in Klinische Hepatologie, Hrsg. Kühne, H.A., Wernze, H.
1. Aufl., Thieme, Stuttgart 1979

29 Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B.
Microbiology
2. Aufl., Harper & Row, Hagerstown Maryland USA 1973

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. H. Liebich danke ich für den hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatz und die intensive Betreuung in Form von vielen Anregungen, Diskussionen und konstruktiver Kritik.

Herrn Dipl. Ing. (FH) J. Wöll danke ich für seine Bemühungen Massenspektrometer und Computer trotz ständiger technischer Probleme betriebsbereit zu halten.

Frl. B. Tetschner danke ich für Ihre engagierte Mithilfe bei der Bearbeitung der Urinproben.

LEBENSLAUF

21.5.1952	Geburt in Berlin Karlshorst (Ost-Berlin) Vater: Dr. Ing. J. Pickert, Bauingenieur Mutter: Dr. med. dent. I. Pickert, Zahnärztin
1959-1963	Grundschule in Berlin-Zehlendorf (West-Berlin) und Stuttgart-Hedelfingen
1963-1971	Gymnasium in Stuttgart-Untertürkheim und Esslingen am Neckar
21.6.1971	Abitur am humanistischen Georgii Gymnasium in Esslingen
1971-1977	Studium der Biologie an der Universität Hohenheim. Diplomarbeit über chromatographischen Hormonnachweis im Urin bei Prof. Dr. rer. nat. P. Renz (Institut für Biologische Chemie)
30.3.1978	Diplom in Biologie
1977-1983	Studium der Medizin an den Universitäten Hohenheim und Tübingen
1979-1983	Experimentelle Arbeiten auf dem Gebiet der Gaschromatographie und Massenspektrometrie im Hauptlabor der Medizinischen Universitätsklinik. Wissenschaftliche Anleitung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. M. Liebich (Abt. Innere Medizin IV)
26.4.1983	Ärztliche Prüfung
5.5.1983	Approbation als Arzt